

**Das *Xenopus* Homolog von *Seven in absentia* (XSiah-2) –
Bedeutung eines neuen Interaktionspartners von DCoH/PCD in
der Entwicklung des Vertebraten-Auges**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften

an der

Universitäts-Gesamthochschule Essen

angefertigt am

Institut für Zellbiologie / Tumorforschung

vorgelegt von

Dipl. Biologe Sven Bogdan

aus Dortmund

Juli 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G.U. Ryffel
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Grunz

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. C. Redies

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.00

ehr alt sind die Steine.
Das Muster des Lebens liegt nicht in ihren Adern.
Als die Erde sich abkühlte, kamen die großen Regenfälle,
und die Meere füllten sich.
Nach und nach verbanden sich die Moleküle
in geordneter Asymmetrie.
Eine Milliarde Jahre verstrich,
Aeonen von Versuch und Irrtum.
Die Botschaft des Lebens nahm Form an, eine Spirale,
eine Helix, die sich endlos wiederholt,
gehüllt in Protein, ernährt von
Enzymen, geschützt durch Membranen,
umspült von Salzwasser, gewappnet mit
Kalk.
Muscheln glitzern am Meeresstrand,
die Brandung brodelte, Seemöwen schreien, und der mächtige Wind
rauscht in der Zypresse.

Thomas H. Jukes, *Molecules and Evolution*, 1966

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 DCoH – ein bifunktioneller Faktor	2
1.2 <i>Seven in absentia</i> – ein neuer putativer Interaktionspartner von DCoH/PCD	7
1.3 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Chemikalien und Enzyme	12
2.2 Oligonukleotide	12
2.3 Isolierung der cDNA von <i>Xenopus</i> Siah-2	13
2.4 Hergestellte Plasmidkonstrukte	15
2.5 Gekoppelte in vitro Transkription / Translation von XSiah-2	16
2.6 <i>Two Hybrid</i> Analysen in Hefe	17
2.7 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) aus Gesamt-RNA von <i>Xenopus</i> Embryonen	17
2.8 Transiente Transfektion und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	19
2.9 Western-Blotting und Immundetektion von His-XSiah-2 und Myc-DCoH/PCD	19
2.10 Haltung von <i>Xenopus laevis</i> und <i>in vitro</i> Befruchtung und Kultur der Embryonen	20
2.11 Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung	21
2.12 <i>In vitro</i> Synthese von mRNA und RNA-Mikroinjektion in <i>Xenopus</i>	22
2.13 Histologische Analysen von <i>Xenopus</i> Larven	22

3. Ergebnisse	24
3.1 Die cDNA des <i>Xenopus</i> Seven in absentia (XSiah) enthält einen offenen Leserahmen von 939 Nukleotiden	24
3.2 Das <i>Xenopus</i> Seven in absentia Homolog ist zu 85 % identisch mit den Säuger Siah-2 Proteinen	28
3.3 XSiah-2 kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa	30
3.4 Der C-Terminus von XSiah-2 ist ausreichend und notwendig für die Interaktion mit DCoH/PCD	31
3.5 XSiah-2 ist wie das <i>Xenopus</i> DCoH/PCD maternal exprimiert	35
3.6 XSiah-2 wird im embryonalen Auge und im Rückenmark exprimiert	36
3.7 XSiah-2 ist nach Transfektion überwiegend im Zytoplasma lokalisiert	38
3.8 DCoH/PCD ist kein Zielprotein einer XSiah-2 vermittelten Degradation	40
3.9 Die Überexpression von XSiah-2 in <i>Xenopus</i> führt zu Augendefekten	41
3.10 Die endogene XPax-6-Expression ist bei XSiah-2-Überexpression unverändert	45
3.11 Die Überexpression von DCoH/PCD beeinflusst den XSiah-2 induzierten Phänotyp nicht und <i>vice versa</i>	47
4. Diskussion	50
4.1 <i>Seven in absentia</i> und DCoH/PCD – zwei maternale Interaktionspartner mit vielfältigen Funktionen	50
4.2 XSiah-2 hat eine Bedeutung in der Augenentwicklung von Vertebraten	55
5. Zusammenfassung	61
6. Literatur	62

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indoylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Cpm	counts per minute
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Foetal Calf Serum
IgG	Immunglobulin G
mRNA	messenger RNA
mut	Mutante
nb	nicht bekannt
NBT	p-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sina	Seven in absentia
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheiten)
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid

Es gelten die Einheiten des SI-Systems

1. Einleitung

Die zentrale Frage in der Entwicklungsbiologie wurde bereits 1883 von August Weismann gestellt: Wie entsteht aus einer einzigen Keimzelle ein komplexer Organismus mit einer Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Zellen? Im Hinblick darauf, dass jede Zelle eines Organismus den gleichen Satz an Genen enthält, knüpfte Thomas Morgan in seinem Nobelpreisvortrag von 1933 an diese Frage an: Warum entwickeln sich trotz des identischen genetischen Materials einige Zellen zu Muskelzellen, einige zu Leberzellen, andere wiederum zu Nervenzellen? Es zeigte sich, dass die differentielle Genexpression eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung der verschiedenen Zelltypen ist. Diese selektive Genexpression wird zum überwiegenden Teil auf der Ebene der Transkription reguliert, was Beermann 1952 erstmalig für die Entwicklung des Insektenorganismus zeigte. Er beobachtete in polytären Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen von *Chironimus* (Zuckmücke) Hormon induzierte Veränderungen des Chromosomen-Puff-Musters im Verlaufe der Entwicklung. Diese sogenannten *Puffs* stellen aktive Chromosomenabschnitte dar, die zum Zweck der Transkription dekondensiert sind, und spiegeln eine differentielle Expression von Genen während der Entwicklung des Insektenorganismus wider.

Die Expression von Genen wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die an regulatorische DNA-Sequenzen im Promotorbereich von Genen binden. Grundsätzlich werden zwei Arten von Transkriptionsfaktoren unterschieden. Dies sind zum einen die basalen Transkriptionsfaktoren, die in jedem Zelltyp ubiquitär vorhanden sind (Buratowski, 1994). Sie binden an DNA-Sequenzen wie die *TATA-Box*, die im Promotor sehr vieler Gene enthalten ist. Zum anderen existieren die sogenannten zell- und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, die die Transkription zelltypspezifischer Gene durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen regulieren. In Verbindung mit den basalen Transkriptionsfaktoren gewährleisten diese gewebespezifischen Faktoren, dass jeder Zelltyp neben ubiquitären Proteinen eine charakteristische Ausstattung zellspezifischer Proteine enthält. So weisen Muskelzellen aufgrund vorhandener muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren typische Proteine (z.B. Aktin, Myosin und Troponin) auf, die in anderen Zelltypen fehlen. Die Bedeutung gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von Zellen ist in einigen Fällen gezeigt worden. So führt das Einbringen myogener Transkriptionsfaktoren wie MyoD und Myogenin in Fibroblasten zur Ausbildung des muskelspezifischen Phänotyps (zur Übersicht: Olson, 1994). Untersuchungen zur

Differenzierung anderer Zelltypen wie beispielsweise Hepatozyten zeigen jedoch, dass die alleinige Expression eines Transkriptionsfaktors zur Zelldetermination häufig nicht ausreicht (zur Übersicht: Sladek and Darnell, 1992). Vielmehr regulieren verschiedene Transkriptionsfaktoren kooperativ die Expression leberspezifischer Gene. In diesem regulatorischen Netzwerk sind die Transkriptionsfaktoren der HNF1 (**H**epatocyte **N**uclear **F**actor **1**) Familie, HNF1 α und HNF1 β wichtig (Mendel et al., 1991a). Beide verwandten Homeodomänenproteine binden als Homo- oder Heterodimere an das HP1-Element (Kugler et al., 1988), eine DNA-Sequenz vor der TATA-Box im Promotorbereich vieler leberspezifischer Gene wie das Albumin-, α -Fetoprotein- oder das α_1 -Antitrypsin-Gen (zusammengefasst: Mendel and Cabtree, 1991). HNF1 α und HNF1 β werden jedoch nicht ausschließlich in Hepatozyten der Leber exprimiert, sondern übernehmen auch in der Niere und im Darm in Kombination mit anderen Faktoren genregulatorische Funktionen (Pontoglio et al., 1996). So beinhaltet der Prozess der Zelldifferenzierung also eine kooperative Aktivität verschiedener zellspezifischer Transkriptionsfaktoren, beispielsweise in Form von Heterodimeren. Zusätzlich wird die Komplexität durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an zellspezifischen Kofaktoren erhöht, die selbst keine DNA binden können. Eine solche Interaktion ermöglicht es, dass derselbe Transkriptionsfaktor abhängig vom zellulären Kontext unterschiedliche Genaktivitäten reguliert, und bewirkt so eine Zunahme der regulatorischen Kapazität (zur Übersicht: Chen, 1999; Mannervik et al., 1999). Viele Homeodomänen enthaltende Transkriptionsfaktoren benötigen zusätzliche Kofaktoren, die ihre DNA-Affinität und DNA-Spezifität entscheidend bestimmen (Vershon, 1996). Ein solcher zelltypspezifischer Kofaktor der HNF1 Proteine ist DCoH, der **D**imerisierungs-**C**ofaktor von **HNF1**.

1.1 DCoH – ein bifunktioneller Faktor

DCoH, ein 11,9 kDa kleines Protein, wurde ursprünglich zusammen mit HNF1 α aus Ratten-Leberkernextrakten isoliert (Mendel et al., 1991b). DCoH ist ein positiver Kofaktor von HNF1 α und HNF1 β , da er das Transaktivierungspotential der HNF1-Proteine in Zelltransfektionsexperimenten erhöht (Mendel et al., 1991b; Citron et al., 1992; Hauer et al., 1993; Pogge von Strandmann and Ryffel, 1995). DCoH bindet an die Dimerisierungsdomäne von HNF1 α/β und stabilisiert so die zur DNA-Bindung notwendige Dimerisierung der beiden Transkriptionsfaktoren (Mendel et al., 1991 b). Eine solche Stabilisierung der HNF1 Dimere könnte das erhöhte Transaktivierungspotential der HNF1 Proteine durch DCoH erklären. Aus

dem äquimolaren Verhältnis des isolierten DCoH-HNF1 α -Komplexes aus Rattenleberextrakten wurde bereits angenommen, dass DCoH als Dimer an das dimere HNF1 α -Molekül bindet. Weitere Immunpräzipitationsanalysen bestätigten diesen stabilen heterotetrameren Komplex bestehend aus jeweils zwei DCoH- und zwei HNF1-Molekülen (α oder β). Die Abbildung 1 zeigt schematisch ein solches Heterotetramer, das an das HP1-Element, die HNF1-Zielsequenz vor der TATA-Box vieler HNF1 α/β regulierter Gene, bindet.

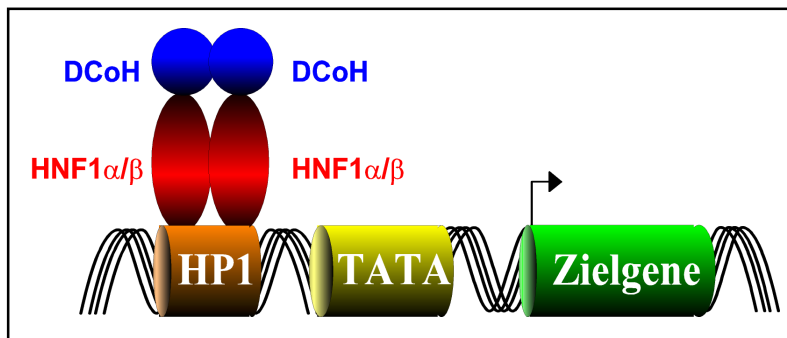


Abb. 1 Schematische Darstellung des DCoH/HNF1-DNA-Komplexes.

Neben der Stabilisierung des HNF1/DNA-Komplexes fördert DCoH zusätzlich eine Interaktion der HNF1 Proteine mit suboptimalen DNA-Zielsequenzen, obwohl es selbst keine DNA bindet (Rhee et al., 1997). Diese Modulation der DNA-Affinität von HNF1 α/β durch DCoH hat möglicherweise eine physiologische Bedeutung für die Regulation von Genen, die in ihren Promotorbereich eine suboptimale HNF1-Erkennungssequenz enthalten.

DCoH wird ebenso wie HNF1 α/β in der Leber und in der Niere exprimiert, aber im Gegensatz zu den HNF1 Proteinen fehlt es im Darm, Magen und im Pankreas (Pogge von Strandmann et al., 1997). Daher könnte DCoH zur Zellspezifität von HNF1 α/β beitragen. Andererseits ist DCoH zusätzlich in Geweben wie dem pigmentierten Augenepithel, dem Hoden und dem Ovar exprimiert, in denen wiederum HNF1 α/β fehlen (Pogge von Strandmann et al., 1998; Lei and Kaufmann, 1999; Resibois et al., 1999). Dies ist ein erster Hinweis auf eine HNF1 unabhängige Funktion von DCoH.

Unabhängig von seiner Bedeutung als transkriptioneller Koaktivator wurde eine zweite Funktion von DCoH gefunden: Das Protein ist als Tetramer enzymatisch aktiv, es ist eine **P**terin-4 α -**C**arbinolamin-**D**ehydratase (**PCD**, EC 4.2.1.96). Die biochemische Reinigung des Enzyms und anschließende Proteinsequenzierung ergab die Identität von DCoH und PCD (Citron et al., 1992). DCoH/PCD katalysiert die Regeneration von Tetrahydrobiopterin (BH₄).

BH₄ fungiert als wichtiges Koenzym vieler Monooxygenasen (Thöny et al., 2000) wie beispielsweise die Phenylalanin-Hydroxylase (PAH), die Phenylalanin zu Tyrosin umsetzt (Abb. 2). Bei der Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin dient Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Elektronendonator und wird zu 4 α -Hydroxy-Tetrabiopterin (4 α -OH-BH₄) oxidiert (Abb. 2, Schritt A). Die zur Regeneration notwendige Dehydratation erfolgt in zwei Schritten: Zunächst überführt die Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase (DCoH/PCD) das 4 α -Hydroxy-Tetrabiopterin in q-Dihydrobiopterin (q-BH₂, Schritt B), das nachfolgend durch die Dihydrobiopterin-Reduktase (DHPR) zu Tetrahydrobiopterin (BH₄) reduziert wird (Schritt C). So steht das regenerierte BH₄ für die Bildung von Tyrosin aus Phenylalanin wieder zur Verfügung. Das Tyrosin hat nicht nur als aromatische Aminosäure eine stoffwechselphysiologische Bedeutung, sondern es dient auch als Ausgangssubstrat zur Synthese des schwarzen Pigmentfarbstoffes Melanin (Schallreuter et al., 1994 a) und einiger Katecholamine wie Dopamin (Nagatsu and Stjarne, 1998; Flatmark, 2000).

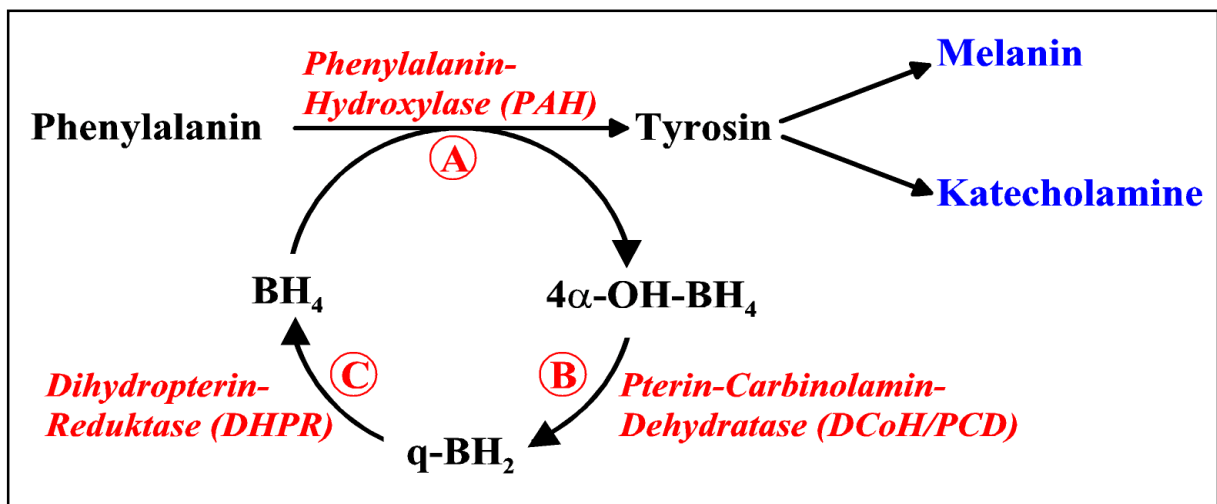


Abb. 2 Schema zur enzymatischen Funktion von DCoH/PCD im Phenylalanin-Hydroxylierungssystem.

Die Bedeutung von DCoH/PCD im Aminosäurenstoffwechsel des Menschen wird durch das Auftreten menschlicher Erkrankungen deutlich. Mutationen im DCoH/PCD Gen sind für eine milde Form der Phenylketonurie (PKA) verantwortlich (Citron et al., 1993; Thöny et al., 1998a; Thöny et al., 1998b). Charakteristisch für die PKA-Patienten ist ein erhöhter Phenylalanin-Spiegel im Blut. Die Ursache hierfür ist eine Hemmung der Phenylalanin-Hydroxylase (Abb. 2 A) durch 7-Biopterin, das bei einem Ausfall von DCoH/PCD spontan aus 4 α -Hydroxy-Tetrabiopterin entsteht (Citron et al., 1993; Thöny et al., 1998).

Gleichzeitig führt die Hemmung der Phenylalanin-Hydroxylase durch 7-Biopterin zu einer erniedrigten Konzentration des Tyrosins. Tyrosin dient u.a. als Ausgangssubstrat zur Synthese des schwarzen Pigmentfarbstoffes Melanin (Flatmark, 2000), so dass eine verringerte Synthese zur Depigmentierung der Haut führen kann. Eine solche Hauterkrankung stellt *Vitiligo* dar, eine menschliche Pigmentierungsstörung, die ebenfalls mit einem Funktionsausfall von DCoH/PCD assoziiert ist (Schallreuter et al., 1994 b; Schallreuter et al., 1994 c). Eine funktionelle Verbindung der regulatorischen und der enzymatischen Aktivität zeigt möglicherweise das PAH-Gen, da es im Promotor funktionelle DNA-Bindestellen für den HNF1/DCoH-Komplex enthält (Lei and Kaufmann, 1998 a). Ein Ausfall von DCoH/PCD führt daher nicht nur zu einer Hemmung der PAH-Aktivität durch 7-Biopterin, sondern vermutlich auch zu einer verminderten PAH-Expression.

Die enzymatische und die regulatorische Aktivität als Koaktivator funktionieren unabhängig voneinander, wie eine detaillierte Mutationsanalyse von DCoH/PCD belegt (Johnen and Kaufman, 1997; Sourdiv et al., 1997). So führen Punktmutationen in den zwei aktiven Zentren von DCoH/PCD, die Pterine binden, zu einem vollständigen Ausfall der enzymatischen Funktion, wohingegen die HNF1-Bindung und die transkriptionelle Koaktivierung vollständig erhalten bleiben. Die beiden trennbaren Funktionen von DCoH/PCD spiegeln sich in der subzellulären Verteilung des Proteins wider: DCoH/PCD ist einerseits im Zellkern von Hepatozyten nachweisbar (Mendel et al., 1991b), was für eine Funktion in der Genregulation spricht. Andererseits ist das Protein zusätzlich im Zytoplasma von Hepatozyten lokalisiert (Huang and Kaufman, 1973), wo es vermutlich an der Regeneration des BH₄ beteiligt ist. Diese unterschiedliche subzelluläre Lokalisation wurde auch in anderen Geweben beobachtet, wie beispielsweise der Niere (Pogge von Strandmann et al., 1998; Resibois et al., 1999), den innervierenden Nerven des Darms (Resibois et al., 1999) oder im Gehirn (Depaepe et al., 2000).

Die hohe evolutionäre Konservierung des DCoH/PCD Proteins in der Genregulation und im Aminosäuremetabolismus wie auch die assoziierten menschlichen Krankheiten sprechen für seine fundamentale Bedeutung: DCoH wurde nicht nur bei Vertebraten (Mendel et al., 1991a; Thöny and Mattei, 1994; Pogge von Strandmann and Ryffel, 1995) und Invertebraten (Seong et al., 1998) gefunden, sondern es existiert auch ein bakterielles Homolog (Zhao et al., 1994). Auch das bakterielle Protein verfügt über die Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase-Aktivität und ist gleichzeitig an der Genexpression der Phenylalanin-Hydroxylase (PAH) beteiligt. Letzteres zeigen Deletionsmutanten, bei denen nicht nur die PCD-Aktivität fehlt, sondern

gleichzeitig die Expression der PAH stark reduziert ist (Zhao et al., 1994; Song et al., 1999). Da in Bakterien HNF1 Homologe bislang nicht gefunden wurden, ist diese regulatorische Aktivität des bakteriellen DCoH/PCD Proteins von HNF1 unabhängig. Ein Einbringen des murinen DCoH/PCD in diese Bakterien führt zur vollständigen Komplementation des Mutanten-Phänotyps (Endrizzi et al., 1995), so dass auch das Säuger Homolog diese HNF1 unabhängige Aktivität besitzt. Da jedoch weder das bakterielle DCoH/PCD Protein noch die Säuger Homologen allein die Expression von Genen regulieren können, ist anzunehmen, dass das DCoH/PCD Protein mit weiteren Faktoren interagiert, die diese konservierte regulatorische Aktivität von DCoH/PCD vermitteln.

Tatsächlich birgt die dreidimensionale Struktur des bakteriellen wie auch des Säuger DCoH/PCD Proteins (Endrizzi et al., 1995; Suck and Ficner, 1995) das Potential, weitere Makromoleküle zu binden. Das DCOH/PCD Dimer besteht aus acht β -Faltblättern und sechs α -Helices, wobei letztere vermutlich eine Interaktion mit HNF1 α/β vermitteln. Insgesamt weist das dimere Protein räumlich eine Sattel ähnliche Struktur auf, die der des basalen Transkriptionsfaktors TBP (**T**ATA-**B**ox **B**inding **P**rotein) ähnelt. Entsprechend dem TBP bilden die β -Faltblätter eine konkave hydrophobe Oberfläche aus, die eine ideale Interaktionsmöglichkeit mit großen Molekülen wie Nukleinsäuren oder Proteinen bietet. Dieser Proteinbereich ist nicht an der Enzymaktivität beteiligt. Da weder das bakterielle noch das Säuger Protein DNA oder RNA binden (Mendel et al., 1991b, Rhee et al., 1997), interagiert das dimere DCoH/PCD Molekül möglicherweise über diesen putativen Interaktionsbereich mit anderen, bislang unbekannten Proteinen.

Weitere Hinweise für eine mögliche HNF1 unabhängige Interaktion mit anderen Faktoren liefert das Expressionsprofil des DCoH/PCD Proteins in der Embryogenese von *Xenopus* und der Ratte. Das *Xenopus* und das Ratten Protein werden zwar in der Leber und im Pronephros mit HNF1 α/β koexprimiert, aber auch im pigmentierten Epithel des Auges, in dem die HNF1 Proteine fehlen (Pogge v. Strandmann and Ryffel, 1995; Pogge von Strandmann et al., 1998). Darüber hinaus ist DCoH/PCD ein maternales Protein (Pogge von Strandmann and Ryffel, 1995; Pogge von Strandmann et al., 1998), wohingegen HNF1 α/β erst deutlich später in der Embryogenese exprimiert werden (Weber et al., 1996; Pogge von Strandmann et al., 1997). Die Funktion von DCoH/PCD als maternales Protein in der Ratte und in *Xenopus* scheint daher sowohl unabhängig von HNF1 α/β als auch von der Dehydratase-Aktivität im Phenylalanin-Hydroxylierungssystems zu sein, da beide in der Embryonalentwicklung erst

wesentlich später nachweisbar sind (Pogge von Strandmann et al., 1997; Thöny et al., 2000). Vor kurzem wurde noch ein Anhaltspunkt für eine HNF1 unabhängige Funktion von DCoH/PCD gefunden: Die Überexpression des DCoH/PCD Proteins führt zur Bildung ektoptischer Pigmentzellen in der Epidermis von *Xenopus* (Pogge v. Strandmann et al., 2000). Da die HNF1 Proteine nicht in der Haut exprimiert werden (Tronche and Yaniv, 1992; Bartkowski et al., 1993), scheint die Induktion ektoptischer Pigmentzellen durch DCoH/PCD unabhängig von HNF1 zu sein. Die Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase-Aktivität von DCoH/PCD ist hierfür ebenfalls nicht essentiell, denn eine DCoH/PCD Mutante ohne enzymatische Aktivität induziert weiterhin die Bildung ektoptischer Pigmentzellen (Pogge v. Strandmann et al., 2000).

Diese Befunde insgesamt waren Anlaß, nach neuen Interaktionspartnern von DCoH/PCD zu suchen. Hierzu wurde eine *Two Hybrid* Analyse mit dem *Xenopus* DCoH/PCD als Zielprotein unter Verwendung einer *Xenopus* Oozyten cDNA-Bank durchgeführt. Tatsächlich wurden mit diesem experimentellen Ansatz neue maternale Interaktionspartner von DCoH/PCD identifiziert (Pogge v. Strandmann et al., unveröffentlicht).

1.2 *Seven in absentia* – ein neuer putativer Interaktionspartner von DCoH/PCD

Eine partielle cDNA, die in der *Two Hybrid* Analyse mit dem *Xenopus* DCoH/PCD als Zielprotein aus einer *Xenopus* Oozyten cDNA-Bank isoliert wurde, weist eine sehr große Homologie zu dem C-Terminus des *Drosophila* Gens *Seven in absentia* (Sina) auf. Sina kodiert ein nukleäres RING-Zinkfingerprotein, das für die Differenzierung des *Drosophila* Auges essentiell ist (Carthew and Rubin, 1990). Ursprünglich wurde das Sina Gen in einer Mutagenese-Analyse nach neuen Augenmutanten von *Drosophila* gefunden.

Fliegen, die Deletionen im Sina Gen aufweisen, zeigen im Vergleich zum Wildtypen (Abb. 3 A) eine geringere symmetrische Anordnung der einzelnen Ommatidien des Komplexauges (Abb. 3 B). Ursache dieser Mißbildung ist das Fehlen der sogenannten R7-Photorezeptorzelle (Abb. 3 C, Pfeil), einer von acht Photorezeptorzellen im Ommatidium des Insektenauges. Die R7-Photorezeptorzelle, die bei der *Seven in absentia* Mutante fehlt (Abb. 3 D), ist für die Rezeption des UV-Lichtes verantwortlich (Carthew and Rubin, 1990).

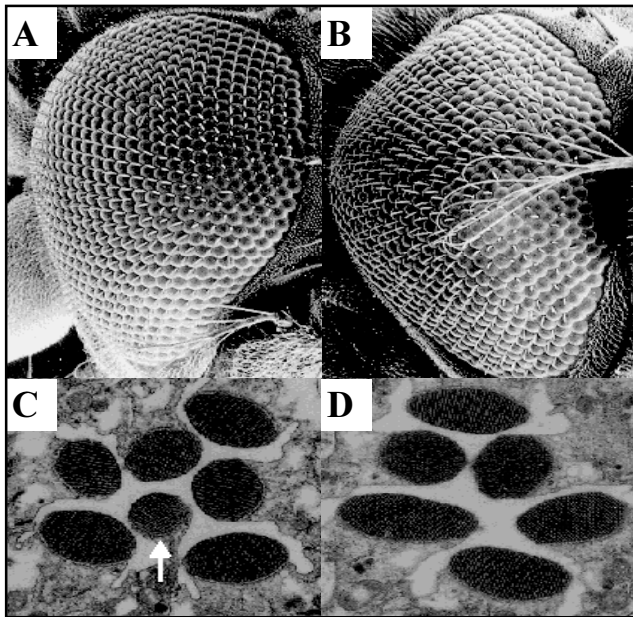


Abb. 3 Phänotyp der *Drosophila Seven in absentia* (Sina) Mutanten (aus: Carthew and Rubin, 1990). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines (A) Wildtyp-Komplexauges und (B) des Komplexauges der Sina Mutante. (C), (D) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Photorezeptorzellen im Ommatidium des Wildtyps (C) und der Sina Mutante (D). Eine der acht Photorezeptorzellen (R8) befindet sich in C und D unterhalb der Schnittebene.

Die zelluläre Funktion von Sina in der Differenzierung der R7-Photorezeptorzellen ist inzwischen gut charakterisiert, so dass die molekulare Ursache des Phänotyps der Sina Mutante bekannt ist (Abb. 4): In Verbindung mit *Phyllopod* (Phyl), einem Zinkfingerprotein, ist Sina an der Ubiquitin abhängigen Degradation des transkriptionellen Repressors *Tramtrack* (Ttk88) beteiligt (Li et al., 1997). Als genereller Inhibitor der neuronalen Differenzierung blockiert *Tramtrack* auch die Entwicklung der R7-Photorezeptorzellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen (Abb. 4). Eine Inaktivierung von Sina führt zu einem fehlenden Abbau von *Tramtrack*. Das stabilisierte *Tramtrack* Protein inhibiert daher permanent die Differenzierung der R7-Photorezeptorzellen, so dass dieser Zelltyp im Ommatidienauge der Sina Mutante fehlt.

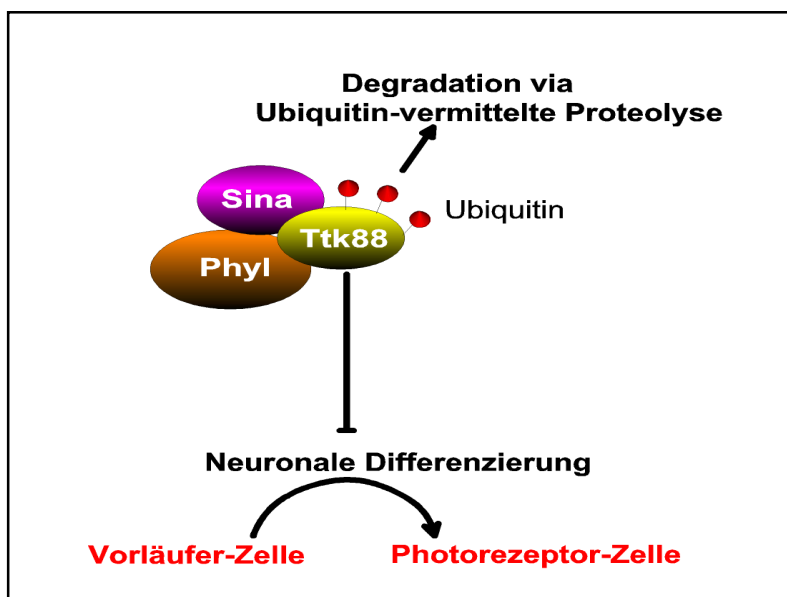


Abb. 4 Schematische Darstellung der molekularen Funktion des *Drosophila Seven in absentia* (Sina) während der Differenzierung der R7-Photorezeptorzellen des Insektenauges (verändert nach Dickson, 1998).

Weiterführende Analysen belegen eine direkte Beteiligung von Sina im Ubiquitinierungssystem. So konnte gezeigt werden, dass Sina genetisch und physikalisch mit dem Ubiquitin konjugierten Enzym UbcD1 interagiert (Tang et al., 1997), einem von drei Enzymkomplexen des Ubiquitinierungssystems (zur Übersicht: Hershko and Ciechanover, 1998).

Mittlerweile sind verschiedene homologe Proteine des *Seven in absentia* (Siah) bei der Maus (Della et al., 1993) und beim Menschen (Hu et al., 1997) identifiziert worden. In der Maus existieren drei Varianten, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Holloway et al., 1997): Zum einen wurden die beiden Isoformen Siah-1A und Siah-1B isoliert, die in ihrer kodierenden Region nur um 25 Nukleotide abweichen. Die dritte Siah Variante im murinen Genom ist das Siah-2, dessen Sequenz sich stärker von den beiden Siah-1 Genen unterscheidet. Beim Menschen sind bislang eine Siah-1 Isoform und das Siah-2 isoliert worden. Insgesamt unterscheiden sich die Säuger Siah-1 Proteine strukturell im wesentlichen im Aminoterminus von den Säuger Siah-2 Proteinen.

Hinsichtlich ihrer zellulären Bedeutung wurden die Siah-1 und die Siah-2 Proteine in ganz unterschiedlichen Kontexten gefunden. Das murine Siah-1A (MSiah-1A) und auch das humane Siah-1 Protein (HumSiah-1) sind an Prozessen des physiologischen Zelltods (Apoptose) und der Zellproliferation beteiligt. So werden das HumSiah-1 während der Apoptose von menschlichen Darmepithelzellen (Nemani et al., 1996) und das MSiah-1A in einer murinen Zelllinie während der p53-induzierten Apoptose (Amson et al., 1996, Relaix et al., 2000) als Zielgene aktiviert. Darüber hinaus führt eine Überexpression von HumSiah-1 in menschlichen Zelllinien zu einer Hemmung des Zellwachstums (Matsuzawa et al., 1998; Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999). Im Gegensatz zu den Siah-1 Proteinen wurden für die Siah-2 Proteine solche anti-proliferierende und Apoptose fördernde Eigenschaften bisher nicht nachgewiesen. Die Säuger Siah-2 Proteine wurden als Interaktionspartner unterschiedlicher Faktoren gefunden (Hu et al., 1997; Zhang et al., 1998; Germani et al., 1999). Einige dieser Interaktionspartner wie beispielsweise DCC und NCoR werden entsprechend dem *Tramtrack* Protein in *Drosophila* durch die Säuger Siah-2 Proteine in den Ubiquitin vermittelten Abbau geführt (Hu et al., 1997; Zhang et al., 1998). Während DCC (**D**eleted in **C**olon **C**ancer) als Netrin-1-Rezeptor an zellulären und axonalen Migrationsprozessen im embryonalen Nervensystem bei Vertebraten und Invertebraten beteiligt ist (Culotti and Merz, 1998), übernimmt N-CoR (**N**uclear receptor **C**orepressor) eine wesentliche Funktion in der Regulation hormonabhängiger Transkriptionsfaktoren (Chen and Li, 1998).

Eine Ubiquitin vermittelte Proteolyse findet jedoch nicht bei allen Interaktionspartnern der Säuger Siah-2 Proteine statt. So wird beispielsweise der Rac1-GDP/GTP-Austauscher *Vav*, der in der Differenzierung hämopoetischer Zellen eine Bedeutung hat (Romero and Fischer, 1996), nicht durch die Säuger Siah-2 Proteine degradiert (Germani et al., 1999).

Die unterschiedliche, subzelluläre Lokalisation der Siah Proteine spiegelt möglicherweise ihre unterschiedlichen zellulären Aktivitäten wider: Während für das humane Siah-1 Protein nach Transfektion eine nukleäre Lokalisation gezeigt wurde (Matsuzawa et al., 1998), wurden sowohl das murine als auch das humane Siah-2 Protein ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (Hu et al., 1997; Germani et al., 1999).

Anders als in *Drosophila* liegen Analysen zur Bedeutung der *Seven in absentia* Homologen in der Entwicklung von Wirbeltieren nicht vor. Erste Hinweise zur möglichen Funktion des *Seven in absentia* in der Embryogenese von Wirbeltieren bietet aber das Expressionsprofil von MSiah-2 in Maus Embryonen. Es wird insbesondere im Knorpelgewebe, im Vorderhirn und im Auge exprimiert (Della et al., 1993). Die Expression von MSiah-2 im Auge weist auf eine mögliche konservierte Funktion dieses Gens in der Augenentwicklung hin. Eine derartige Konservierung genetischer Systeme in der Embryonalentwicklung verschiedener Tiere wurde insbesondere für die Augenentstehung mit der Entdeckung des Homeobox-Gens Pax-6 eindrucksvoll gezeigt. Mutationen in diesem Gen rufen in *Drosophila*, in der Maus und beim Menschen denselben Phänotyp hervor: ein Verlust des Auges (zur Übersicht: Zuker, 1994). Die Induktion ektopischer Augen in *Drosophila* (Halder et al., 1995) und in *Xenopus* (Chow et al., 1999) durch Überexpression von Pax-6 bestätigen die konservierte Funktion dieses Faktors als ein "master control gene" vieler Augentypen. Trotz der enormen morphologischen und physikalischen Unterschiede zwischen dem Linsenauge der Wirbeltiere und dem Komplexauge der Fliegen wird daher eine Evolution von einem gemeinsamen Prototypen angenommen (Gehring and Ikeo, 1999).

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob das *Seven in absentia* auch in der Augenentwicklung von Wirbeltieren eine Bedeutung hat. Die funktionelle Charakterisierung des *Xenopus Seven in absentia* (XSiah) bietet einen guten Ansatz, diese Fragestellung zu beantworten. *Xenopus laevis*, der afrikanische Krallenfrosch, ist besonders gut für diese Untersuchungen geeignet: Dieser Organismus stellt ein ausgezeichnetes Wirbeltier-Modell zum Studium embryonaler Differenzierungsprozesse wie der Augenentwicklung dar (Dawid and Sargent, 1988; Grunz, 1990; Dawid et al., 1990; Danilchick et al., 1991). Die leicht

durchführbare *in vitro* Befruchtung der relativ großen Froscheier sowie die schnelle extrakorporale Entwicklung sind wichtige Vorteile von *Xenopus*. Diese bieten eine gute Beobachtungsmöglichkeit und einen direkten Zugang zu den Embryonen, insbesondere für Manipulationen.

Außerdem ist ein direkter Vergleich mit dem Expressionsprofil des putativen Interaktionspartner DCoH/PCD möglich, da seine Expression während der Embryogenese von *Xenopus* sehr detailliert untersucht wurde (Pogge v. Strandmann and Ryffel, 1995). Dies könnte Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen XSiah und DCoH/PCD in der Embryogenese von Wirbeltieren geben.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stellt die Identifizierung einer *Xenopus* cDNA dar, die eine signifikante Homologie zu dem *Drosophila* Gen *Seven in absentia* (Sina) aufweist. Da diese cDNA unvollständig ist, sollte zunächst die vollständige cDNA aus einer *Xenopus* Oocyten-cDNA-Bank isoliert werden.

In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob das vollständige XSiah Protein mit dem *Xenopus* DCoH/PCD physikalisch interagiert, um so die bereits im *Two Hybrid* System gezeigte Interaktion der partiellen cDNA zu bestätigen.

Um erste Hinweise auf die Funktion des bislang in *Xenopus* unbekannten Faktors zu erhalten, sollte ein detailliertes Expressionsprofil von XSiah erstellt werden. Da das Expressionsmuster des putativen Interaktionspartners DCoH/PCD während der Embryogenese von *Xenopus* bereits gut untersucht wurde, gestatten diese Analysen auch erste Einblicke in eine mögliche Verbindung zwischen XSiah und dem *Xenopus* DCoH/PCD.

Hat das *Xenopus Seven in absentia* einen Einfluß auf die Entwicklung des Vertebraten-Auges? Welche Auswirkungen hat die Überexpression einer XSiah Mutante in *Xenopus*, die der natürlichen *Drosophila* Mutante mit fehlenden R7-Photorezeptorzellen entspricht? Anhand von Überexpressionsstudien, die in *Xenopus* Embryonen durch Mikroinjektion *in vitro* synthetisierter mRNA gut durchführbar sind, sollten diese Fragen beantwortet werden.

2. Material und Methoden

Molekularbiologische Versuche erfolgten, soweit nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen von Maniatis et al. (1982) oder Aushubel et al. (1989).

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, in analytischer Qualität von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Biorad (München), Biozym (Hameln), Boehringer (Mannheim), Difco (Detroit), Eurogentec (Seraing), Fluka (Neu-Ulm), Gibco (Eggenstein), Invitrogen (Leek), MBI Fermentas (Vilnius), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Quiagen (Hilden), Riedel de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und Stratagene (La Jolla) bezogen.

2.2 Oligonukleotide

Nr.	Sequenz (5'→3')	Restriktionsschnittstellen	Verwendungszweck
1	GCG GCC GCA AGC TTA TGA GCC GCC CGT CCT CT	<i>NotI, HindIII</i>	Sense Primer zur Amplifikation von XSiah-2-wt
2	CCG GCG CCT CTA GAT TAT GGA CAA CAT GTG GAA A	<i>XbaI, ApaI</i>	Antisense Primer zur Amplifikation von XSiah-2-wt
3	GCT CTA GAG CTC AGT CAA CAG CAC CGG GC	<i>XbaI</i>	Antisense Primer zur Amplifikation von XSiah-2ΔC
4	GGA GCT GAC GTC GCT GGC CTC CCT CAC CCC G	—	Sense Primer zur Amplifikation von XSiah-2ΔR
5	CGG GGT GAG GGA GGC CAG CGA CGT CAG CGT CAG CTC C	—	Antisense Primer zur Amplifikation von XSiah-2ΔR
6	AAG CGG CCG CAA GCT TTG ATG AGC CGC CCG TCC TCT	<i>NotI, HindIII</i>	Sense Primer zur Herstellung von His-XSiah-2-wt
7	TCT AGA GGG CCC TTA TGG ACA ACA TGT GGA A	<i>ApaI, XbaI</i>	Antisense Primer zur Herstellung von His-XSiah-2-wt

8	ATG AGC CGC CCG TCC TCT GCC GGA CCC TCG	—	Sense Primer zur RT-PCR von XSiah-2-wt
9	TTA TGG ACA ACA TGT GGA AAT GGT TAC ATT	—	Antisense Primer zur RT-PCR von XSiah-2-wt
10	TAC CAC TAC AAT GGA TG	—	Sense Primer zur Sequenzierung von pGAD10
11	AAT GGA TTT CAG AGA CCA	—	Sense Primer zur RT-PCR von ODC
12	CCA AGG CTA AAG TTG CAG	—	Antisense Primer zur RT-PCR von ODC

2.3 Isolierung der cDNA von *Xenopus* Siah-2

Zur Isolierung der XSiah-2 cDNA aus *Xenopus laevis* wurde eine λ gt11 5'-STRETCH cDNA-Bank aus *Xenopus* Oocyten (Clontech, Palo Alto) verwendet. Als Hybridisierungssonde wurde ein 1200 bp großes *EcoRI*-Fragment aus dem Plasmid-Konstrukt SK/XSiah-C (Pogge von Strandmann et al., unveröffentlicht) eingesetzt, das 189 bp der kodierenden Region von XSiah-2 enthält. Dieses Fragment wurde nach Agarosegel-Extraktion mit dem QiaexII Kit (Qiagen, Hilden) unter Verwendung des Rediprime Labeling Kit (Stratagene, San Diego) mit α -³²CTP radioaktiv markiert. Die Hybridisierungssonde wurde anschließend mit dem Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Anzucht und die Filter-Plaque-Hybridisierung erfolgten nach den Empfehlungen des Herstellers. Pro Phagenfilter (Nitrozellulose-Membran Hybond C, Amersham, Braunschweig) wurden 1×10^6 cpm der markierten Probe eingesetzt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 68°C durchgeführt.

Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter bei 68°C je 30 min in 1x SSC, 0,1% SDS; 0,1x SSC, 0,1% SDS; 0,1x SSC und 0,5% SDS gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Autoradiographie-Film X-OMAT (Kodak, Rochester, New York). Inserts positiver Phagenklone wurden mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit λ gt11-spezifischen Oligonukleotiden (Clontech, Palo Alto) amplifiziert. Für die PCR wurde ausschließlich der TRIOthermoblock (Biometra, Göttingen) verwendet.

Es wurde folgender Reaktionsansatz (50 μ l) und folgendes PCR-Zyklusprofil genutzt:

PCR-Ansatz

je 50 pg Oligonukleotid-Primer λ gt11
 je 1,25 mM dNTPs (N = A, G, C, T)
 1 mM $MgCl_2$
 0,3 U Taq-DNA-Polymerase
 (Goldstar-RED, Eurogentec, Seraing)
 75 mM Tris/HCl pH 9.0
 20 mM $(NH_4)_2SO_4$
 0,01 % (w/v) Tween 20

PCR-Zyklusprofil

Denaturierung	3 min	94°C	30- 40 x
Denaturierung	1 min	94°C	
Hybridisierung	1 min	50°C	
Amplifikation	2 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	
Ende	∞	04°C	

Die Reaktionsansätze wurden mit Mineralöl überschichtet. Für nachfolgende Restriktionen wurden die PCR-Amplifikationsprodukte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit einer Southern Blot Analyse überprüft. Hierzu wurden die DNA-Fragmente gelektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend 15 min mit 0,25 M HCl, dann je 30 min mit Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,5) gespült. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond N, Amersham, Braunschweig) erfolgte unter Verwendung einer Kapillarblotvorrichtung mit 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natrium-Citrat, pH 7,0) nach Southern (1979).

Die Fixierung der DNA auf die Membran wurde mit einem UV-Crosslinkers (Stratagene, La Jolla) mit 120 mJ/cm^2 durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen in 10x SSC wurde die Membran zunächst mit Hybridisierungspuffer (nach dem Protokoll der Fa. Clontech, Palo Alto) 4 h bei 65°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit einer spezifischen XSiah-2 Sonde ($1-2 \times 10^6 \text{ cpm / ml}$), die mit dem Rediprime Labeling Kit (Stratagene, San Diego) mit α - ^{32}CTP radioaktiv markiert wurde, erfolgte über Nacht bei 65°C. Nachfolgend wurde die Membran bei 68°C je 30 min in 1x SSC, 0,1% SDS; 0,1x SSC, 0,1% SDS und 0,1x SSC, 0,5% SDS gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Autoradiographie-Film X-OMAT (Kodak, Rochester, New York).

Nach der Southern Analyse wurden die cDNA-Fragmente (Phagenklon 9 und 11) unter Verwendung der Oligonukleotide λ -gt11 mittels PCR amplifiziert und dann über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* in den Vektor pBluescriptSK⁺ (Statagene, San Diego) kloniert (SK-Konstrukte). Die nachfolgende Sequenzierung der SK-Konstrukte wurde mit doppelsträngiger DNA aus Qiagen-tip500-Präparationen (Qiagen, Hilden), T3/T7-Primern und mit fluoreszenzmarkierten ddNTP nach dem BigDye-Primer-Cycle-Sequencing Protokoll (Applied Biosystem, Weiterstadt) vom DNA-Sequenzier-Service

der Medizinischen Fakultät in Essen durchgeführt. Die automatische Analyse der Sequenz fand mit dem ABI-377-System (Applied Biosystem, Weiterstadt) statt.

2.4 Hergestellte Plasmidkonstrukte

Die Inserts aller im folgenden aufgeführten Plasmidkonstrukte wurden sequenziert:

(A) SK/XSiah-2: Die 2200 Nukleotide große cDNA des Phagenklons 11 wurde unter Verwendung der Oligonukleotide λ -gt11 (Clontech, Palo Alto) mittels PCR amplifiziert. Nach Restriktion des PCR-Produktes mit *EcoRI* wurde das Fragment mit dem ebenfalls *EcoRI* restringierten Vektor pBluescriptSK+ (Stratagene, San Diego) ligiert.

(B) Rc/XSiah-2: Mit Hilfe der Oligonukleotide 1 und 2 (Sequenzen unter 2.2) wurde die kodierende Region der XSiah-2 cDNA (Position 1 bis 942) unter Verwendung des Vektors SK/XSiah-2 als DNA-Matrize amplifiziert. Über die angehängten Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* wurde das cDNA-Fragment mit dem ebenfalls *HindIII/XbaI* restringierten Vektor RcCMV (Invitrogen, Leek) ligiert.

(C) Rc/XSiah-2-Mut: Zur Herstellung einer Rasterschubmutation wurde der Vektor Rc/XSiah-2 mit *NheI* (Position 32 relativ zum ATG Startcodon) restringiert, anschließend mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und religiert. Dies führt zur Insertion von vier Nukleotiden und es kommt nach einem Rasterschub zu einem vorzeitigen Stop in Position 37 relativ zum ATG Startcodon.

(D) Rc/XSiah-2 Δ C: Unter Verwendung der Oligonukleotide 1 und 3 (Sequenzen unter 2.2) wurden die ersten 618 Nukleotide der kodierenden Region von XSiah-2 aus dem Vektor Rc/XSiah-2 amplifiziert und über die angehängten Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* mit dem ebenfalls *HindIII/XbaI* restringierten Vektor RcCMV (Invitrogen, Leek) ligiert.

(E) Rc/XSiah-2 Δ R: Mit einem Mutagenese-Kit (Stratagene, San Diego) und den Oligonukleotiden 4 und 5 (Sequenzen unter 2.2) wurde die Deletion XSiah-2- Δ 204-312 in den Vektor Rc/XSiah-2 eingefügt.

(F) Rc/His-XSiah-2: Mit Hilfe der Oligonukleotide 6 und 7 (Sequenzen unter 2.2) wurde die kodierende Region von XSiah-2 (Position 1 bis 942) aus dem Vektor

Rc/XSiah-2 amplifiziert und nach Restriktion mit *HindIII* und *ApaI* mit dem ebenfalls *HindIII/ApaI* restringierten Vektor Rc/His-HNF4 (Pogge von Strandmann et al., 1995) ligiert.

(G) Rc/His-XSiah-2 Δ C: Nach Restriktion des Vektors Rc/XSiah-2- Δ C mit *HindIII* und *ApaI* wurden das *HindIII/ApaI*-Fragment (Position 1-163 von XSiah-2) und das *ApaI*-Fragment (Position 164-618 von XSiah-2 relativ zum ATG Startcodon) isoliert. Zunächst wurde das *HindIII/ApaI*-Fragment (Position 1-163 von XSiah-2) mit dem *HindIII/ApaI* restringierten Vektor Rc/His-XSiah-2 ligiert. Nach erneuter Restriktion dieses Zwischenkonstruktes mit *ApaI* wurde das *ApaI*-Fragment (Position 164 –618 von XSiah-2) eingefügt.

(H) pGAD/XSiah-2-wt: Ein 2200 Nukleotide großes *Sall*-Fragment der XSiah-2 cDNA (Position –63-2132 relativ zum ATG Startcodon)) wurde aus dem Vektor SK/XSiah-2 restringiert und in den *XhoI*-restringierten Vektor pGAD10 (Clontech, Palo Alto) eingefügt, wobei die *Sall*-Schnittstelle kompatibel zu *XhoI* ist.

(I) pGAD/XSiah-2- Δ C: Ein 460 Nukleotide großes *ApaI*-Fragment der XSiah-2 cDNA (Position 164-618 relativ zum ATG Startcodon) aus dem Vektor Rc/XSiah-2- Δ C wurde mit dem *ApaI* restringierten Vektor pGAD/XSiah-wt ligiert.

(J) pGAD/XSiah-2- Δ R: Ein 570 Nukleotide großes *ApaI/PstI*-Fragment aus dem Vektor Rc/XSiah-2 Δ R (Position 164-835 relativ zum ATG Startcodon mit Deletion Δ 204-312) wurde in den *ApaI/PstI* restringierten Vektor pGAD/XSiah-wt eingefügt.

Die angegebenen Positionen der Nukleotide der XSiah-2-cDNA beziehen sich auf die in der Abb. 7 dargestellten Sequenz (S. 27), die unter der Zugangsnummer AF 155509 in der NCBI-Genbank hinterlegt wurde.

2.5 Gekoppelte *in vitro* Transkription / Translation von XSiah-2

Die Synthese von [³⁵S]-Methionin radioaktiv markierten Proteinen wurde im TNT gekoppelten Retikulozytenlysat-System (Promega, Madison) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese des rekombinanten XSiah-2 Proteins fand unter Verwendung des Vektors SK/XSiah-2 und der T7-RNA-Polymerase statt. Nach der Synthese wurden 10 μ l Retikulozytenlysats mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (5x)

versetzt und die enthaltenen Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des XSiah-2 Proteins erfolgte autoradiographisch.

SDS-Probenpuffer (1x)

10 % Glyzerin
5 % β -Mercaptoethanol
3 % SDS
1 % Bromphenolblau
63,5 mM Tris-HCl pH 6,8

10x Laufpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 7,5
3,8 M Glycin
1,0 % SDS

2.6 Two Hybrid Analysen in Hefe

Der Nachweis einer physikalischen Interaktion zwischen XSiah-2 und DCoH/PCD mit Hilfe des *Two Hybrid* Systems wurde mit Hilfe des *Matchmaker Two hybrid* Systems (Clontech, Palo Alto) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für diese Experimente wurde der Hefestamm HF7c verwendet. Zur Sequenzierung der pGAD/XSiah-2 Expressionsvektoren (2.4) wurde das Oligonukleotid 10 (2.2) verwendet.

2.7 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) aus der Gesamt-RNA von *Xenopus* Embryonen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Xenopus* Embryonen erfolgte mittels Phenol/Chloroform Extraktion unter Verwendung von RNA-Clean (AGS, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Zur Präparation von RNA aus vier Embryonen wurden jeweils 300 μ l der RNA-Clean-Lösung verwendet. Die Menge der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt und unmittelbar zur reversen Transkription eingesetzt. Zur reversen Transkription wurde ausschließlich die SuperscriptII-reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) eingesetzt.

Die reverse Transkription von 1 μ g RNA wurde wie folgt durchgeführt:

RT-Ansatz	
12 µl (= 1 µg)	RNA
1 µl	0,1M Hexanukleotide
<i>10 min 70°C</i>	
4 µl	Transkriptionspuffer (Gibco)
2 µl	0,1M DTT
1 µl	1,25 mM dNTP
<i>10 min 25°C</i>	
1 µl	SuperscriptII-reverse Transkriptase (Gibco)
<i>50 min 42°C</i>	
<i>15 min 70°C</i>	

Es wurde stets ein Ansatz ohne SuperscriptII-reverse Transkriptase durchgeführt, um später DNA-Kontaminationen ausschließen zu können. Die anschließende PCR zur Amplifikation von XSiah-2 wurde mit den Oligonukleotiden 8 und 9 (2.2) durchgeführt. Zur Amplifikation der ODC (Ornithin-Decarboxylase) wurden die Oligonukleotide 11 und 12 (2.2) verwendet. Folgender RT-PCR Ansatz wurde zur Amplifikation von XSiah-2 und ODC gewählt:

RT-PCR-Ansatz	
2 µl	RT-Ansatz (oder –RT-Ansatz)
5 µl	10 x Goldstar-Reaktionspuffer (Eurogentec, Seraing)
1 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	5'- Oligonukleotid-Primer (0,25 µg/µl)
1 µl	3'- Oligonukleotid-Primer (0,25 µg/µl)
5 µl	1,25 mM dNTP
1 µl	0,1 µCi/µl [α - ³² P]-dCTP
1 µl	Goldstar-RED-Taq-Polymerase (Eurogentec, Seraing)
ad 50 µl	A.dest

RT-PCR-Profil		
Phase	<i>XSiah-2</i>	<i>ODC</i>
Denaturierung	2 min 94°C	2 min 94°C
Denaturierung	1 min 94°C	1 min 94°C
Hybridisierung	1 min 55°C	1 min 44°C
Amplifikation	2 min 72°C	1,5 min 72°C
Elongation	7 min 72°C	7 min 72°C
Ende	∞ 4°C	∞ 4°C
Zyklenanzahl	30	30
PCR-Produkt	1000 bp	234 bp

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 20 µl der RT-PCR-Ansätze auf ein 6 % - iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach 15 minütiger Fixierung des Gels in 10 % Essigsäure und anschließender Geltrocknung erfolgte die Detektion der PCR-Produkte autoradiographisch.

2.8 Transiente Transfektion und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von 293-Zellen

Die Kultivierung der 293-Zellen (humane, embryonale Niere, E1A transformiert) fand in nach Dulbecco modifizierten Eagles Medium (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1mM Glutamin bei 37°C, 7,0 – 7,8 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt. Zur transienten Transfektion von 293-Zellen mit den Expressionsvektoren Rc-His-XSiah-2, Rc-His-XSiah-2ΔC (diese Arbeit, 2.4) und pCS-Myc-DCoH/PCD (Pogge von Strandmann, unveröffentlicht) wurde entweder die Kalziumphosphat-Kopräzipitation nach Zapp et al. (1993) oder die Effectene-Methode (Qiagen, Hilden) verwendet. Zur Transfektion von 5x10⁴ Zellen wurden je 1 µg DNA, 7,5 µl Effectene-Reagenz sowie 5 µl Enhancer eingesetzt. Bei beiden Transfektionsmethoden wurden Kulturschalen mit 1cm Ø verwendet. Der Immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von Myc-DCoH/PCD, His-XSiah-2 und His-XSiah-2ΔC in transient transfizierten 293-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Pogge von Strandmann et al. (1995). Die ersten Antikörper Anti-Myc- und Anti-6xHis-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5 in DMEM verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein Cy3-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:200 verdünnt in PBS-Puffer / 10 % Ziegenserum. Die Analysen wurden mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.

2.9 Western-Blotting und Immundetektion von His-XSiah-2 und Myc-DCoH/PCD

Zum immunologischen Nachweis von His-XSiah-2 und Myc-DCoH/PCD aus transient transfizierten 293-Zellen wurden die Zellen zunächst in eiskaltem NP-40-Puffer (50 µl/10⁵ Zellen) lysiert. Nach Zentrifugation (5 min., 14000 rpm, 4 °C) der Lysate wurden die Überstände mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (5x) versetzt und die enthaltenen Proteine (je 20 µg) unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Der

anschließende elektrophoretische Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose wurde mit Hilfe einer Trans-Blot SD-Transferkammer (Biorad, München) bei 2 mA/cm² für 1 h durchgeführt. Nach Waschen mit PBS-Puffer wurde die Nitrozellulose-Membran mit 0,5 % Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim) in PBS 1 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation des spezifischen, ersten Antikörpers erfolgte in der jeweiligen Verdünnung über Nacht bei 4°C.

Antikörper gerichtet gegen	eingesetzte Verdünnung	Quelle
Myc-Epitop	1 : 5 in DMEM	Evan et al., 1985
6xHistidin	1 : 10 in 1x PBS/0,05 % Tween20	Pogge von Strandmann et al., 1995

Nach Waschen mit PBS / 0,05 % Tween20 (5x je 20 min) wurde der Membran mit Meerretich-Peroxidase gekoppelten anti-Maus-Antikörpern (1: 5000 verdünnt in 0,2 % Blockingreagenz) 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS / 0,05 % Tween20 (5x je 20 min) wurde zur Immundetektion das ECL-Western-Blotting-Detektionssystem (Amersham, Braunschweig) nach Herstellerangaben eingesetzt.

NP-40-Puffer

0,5 % (v/v) NP-40
20 % (v/v) Glycerin
50 mM Tris, pH7,5
150 mM NaCl
1 mM DTT
0,1 mM PMSF

Transferpuffer

48 mM Tris
39 mM Glycin
0,375 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Methanol

PBS-Puffer

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,3

2.10 Haltung von *Xenopus laevis* und *in vitro* Befruchtung und Kultur der Embryonen

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde von der Fa. Xenopus (USA) bezogen. Die Frösche wurden unter Standardbedingungen (Kay and Peng, 1991) gehalten. Die Eiablage geschlechtsreifer Weibchen wurde durch subcutane Injektion von 600 bis 800 Einheiten des humanen Chorion-Gonadotropins Pregnesin (Serono, Unterschleißheim) in den dorsalen Lymphsack induziert. Zur Befruchtung der Eier wurde einem männlichen Tier der Hoden unter Betäubung mit 0,5 % MS 222 entnommen. Der Hoden wurde in Holfreter-Lösung bei 4°C bis zu einer Woche gelagert. Frisch gelegte Eier wurden in Petrischalen durch Überstreifen des intakten Hodens befruchtet und nach fünf Minuten mit 0,1x MBS überschichtet. Eine

erfolgreiche Befruchtung ist anhand der nach 20 Minuten einsetzenden Kortikalreaktion sichtbar, bei der sich der pigmentierte animale Pol nach oben dreht. Nach ca. 45 Minuten wurde die Gallerthülle durch eine 1-2 minütige Inkubation in 2 % (w/v) Cystein, pH 8 entfernt. Nach mehrmaligem Waschen der enthüllten Eier mit 0,1x MBS fand die Kultivierung der Embryonen in 0,1x MBS bei 14 - 23 °C statt. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte nach Nieuwkoop and Faber (1975).

1x MBS

88 mM NaCl	0,82 mM MgSO ₄
1 mM KCl	2,4 mM NaHCO ₃
0,41 mM CaCl ₂	10 mM HEPES, pH 7,4
0,33 mM Ca (NO ₃) ₂	

Holfreter-Lösung

60 mM NaCl
0,6 mM KCl
0,9 mM CaCl ₂
0,2 mM NaHCO ₃

2.11 Whole mount *in situ* Hybridisierung

Die Whole Mount *in situ* Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Harland (1990) durchgeführt. Die Synthese aller Digoxigenin markierten RNA-Proben erfolgte mit dem DIG-RNA-Labeling-Kit (Boehringer, Mannheim). Die als Matrize dienenden Vektoren wurden zuvor unter Verwendung eines Restriktionsenzym linearisiert und wie folgt zur Synthese der Sense- bzw. Antisense RNA verwendet:

Probe	Vektor	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase	Quelle
DCoH/PCD Antisense RNA	SK/DCoH/PCD	<i>BamHI</i>	T7	Pogge von Strandmann et al., 1995
DCoH/PCD Sense RNA		<i>HindIII</i>	T3	
XSiah-2 Antisense RNA	SK/XSiah-2	<i>BamHI</i>	T7	diese Arbeit
XSiah-2 Sense RNA		<i>HindIII</i>	T3	
XPax-6 Antisense RNA	n.b.	<i>EcoRI</i>	T3	Krieg P. (Austin)

In Abweichung zum Protokoll von Harland wurden die RNA-Proben nicht hydrolysiert. Zur Verbesserung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses wurde die alkalische Phosphatase-Reaktion über Nacht ohne Schütteln bei 4 °C durchgeführt.

2.12 *In vitro* Synthese von mRNA und RNA-Mikroinjektion in *Xenopus*

Die *in vitro* RNA Synthese erfolgte nach dem Protokoll von Nielsen und Shapiro (1986). Zur Synthese wurden stets 3 µg linearisierter Vektor und 100 U RNA-Polymerase verwendet. RcCMV-Derivate wurden mit dem Restriktionsenzym *NaeI* linearisiert und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert; pCS-Derivate hingegen mit dem Restriktionsenzym *PvuII* und mit der SP6-RNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde nach Synthese und enzymatischen Abbau der DNA (Nielsen und Shapiro, 1986) einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (24:24:1) Extraktion unterzogen und nachfolgend mit Ethanol p.A. gefällt. Jeder gefällte Ansatz wurde auf 4 Aliquots verteilt. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte photometrisch. Zur qualitativen Bewertung der RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die synthetische mRNA wurde nach Ethanol-Präzipitation in DEPC-behandelten Aqua dest. aufgenommen. Zur Injektion befruchteter Eier wurden Mikrokapillaren (Ø 0,58 mm, World Precision Instruments, Sarasota) unter Verwendung der Injektionsapparatur PicospritzeII (General Valve Corporation, Fairfield) benutzt. In eine Blastomere eines Zwei-Zell Embryos wurde maximal 1ng RNA in einem Volumen von 10-20 nl injiziert. Um ein Auslaufen der injizierten Embryonen zu verhindern, wurden alle Injektionen in 4 %-Ficoll-Lösungen (nach 2 h Wechsel mit 0,1x MBS) durchgeführt.

2.13 Histologische Analyse von *Xenopus* Larven

Zur histologischen Analyse wurden *Xenopus* Larven (Stadium 39-42) nach folgendem Protokoll fixiert und eingebettet:

<u>Dauer</u>	<u>Lösung</u>
1 x 1h	4 % Paraformaldehyd in PBS
24 h	PBS
2 x 2h	70 % Ethanol
2 x 2h	80 % Ethanol
2 x 2h	90 % Ethanol
2 x 2h	96 % Ethanol
2 x 2h	100 % Isopropanol
2 x 2h	Histoclear
48 h	100 % Parafin

Nach Einbettung der Larven in Paraffin wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt. Zum Entparaffinieren und zur anschließenden Übersichtsfärbung wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll behandelt:

<u>Dauer</u>	<u>Lösung</u>		
		1 x 5min	Hematoxylin
		1 x 10 min	Leitungswasser
2 x 10 min	Histoclear	1 x 5 min	Eosin
1 x 1 min	100 % Isopropanol	4 x 1 min	100 % Ethanol
1 x 1 min	96 % Ethanol	2 x 5 min	Histoclear
1 x 1 min	90 % Ethanol		
1 x 1 min	80 % Ethanol		
1 x 1 min	70 % Ethanol		

Zur Konservierung wurden die gefärbten Schnitte in Kunstharz eingedeckelt.

3. Ergebnisse

DCoH/PCD ist ein bifunktionelles Protein, das einerseits enzymatisch aktiv ist und andererseits in Verbindung mit den Transkriptionsfaktoren der HNF-1 Familie an der Genregulation beteiligt ist. Unabhängig von diesen Funktionen liegt DCoH/PCD als maternales Protein im Ei (*Xenopus* und Ratte) vor und wird in anderen Zelltypen exprimiert. Daher war es sinnvoll weitere mögliche Interaktionspartner von DCoH/PCD zu identifizieren. Mit einer genetischen *Two Hybrid* Analyse wurden tatsächlich verschiedene cDNA-Fragmente aus einer *Xenopus* Oocyten cDNA-Bank isoliert (Pogge von Strandmann et al., unveröffentlicht). Eine isolierte partielle cDNA, die im folgenden als XSiah-C bezeichnet wird, weist 77 % Identität in 170 Nukleotiden mit dem C-Terminus des *Drosophila* Gens *Seven in absentia* (*Sina*) auf (Abb. 5). Die Homologie zwischen der 1200 bp großen *Xenopus* cDNA (rotes Rechteck) und *Sina* bricht mit dem Stopcodon der 948 Nukleotide umfassenden kodierenden Region von *Sina* ab. Es folgen 1000 Nukleotide des 5'-untranslatierten Bereiches (roter Pfeil).

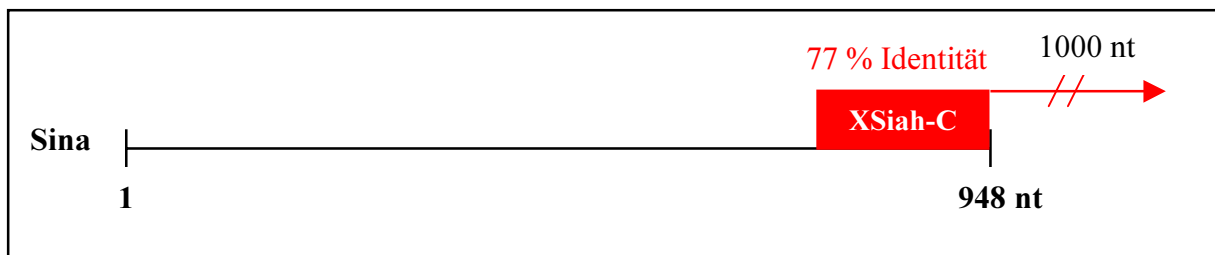


Abb. 5 Vergleich zwischen der partiellen *Xenopus* cDNA (XSiah-C) und der kodierenden Region der *Drosophila* *Seven in absentia* (*Sina*) cDNA.

Um die Funktion des *Xenopus* *Seven in absentia* Homologs (XSiah) in der Embryogenese und seine mögliche Interaktion mit DCoH/PCD zu untersuchen, war es zunächst notwendig, die Vollängen-cDNA aus *Xenopus* zu isolieren.

3.1 Die cDNA des *Xenopus* *Seven in absentia* (XSiah) enthält einen offenen Leserahmen von 939 Nukleotiden

Die Vollängen-cDNA des *Xenopus* *Seven in absentia* Homologs (XSiah) wurde mittels Filter-Plaque-Hybridisierung aus einer *Xenopus* Oocyten cDNA-Bank isoliert. Insgesamt wurden 4×10^6 Phagen-Klone der cDNA-Bank ($2,5 \times 10^6$ unabhängige Klone) untersucht. Als Sonde diente ein 189 bp großes Fragment des *Two Hybrid* Klons XSiah-C, das den Homologiebereich von 170 Nukleotiden enthielt. Es wurden zwei unabhängige Klone isoliert

(Klon 9 und Klon 11), die mit der Sonde hybridisierten. Nach Vereinzelung beider Phagenklone wurden deren cDNA-Inserts unter Verwendung Phagen spezifischer Oligonukleotide mittels PCR amplifiziert. So konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Southern Blot Analyse ein 1200 bp großes Insert des Phagenklons 9 sowie ein 2200 bp großes Insert des Klons 11 identifiziert werden, die mit der eingesetzten Sonde hybridisieren. Die Abbildung 6 dokumentiert exemplarisch die Southern Blot Analyse des Phagenklons 11.

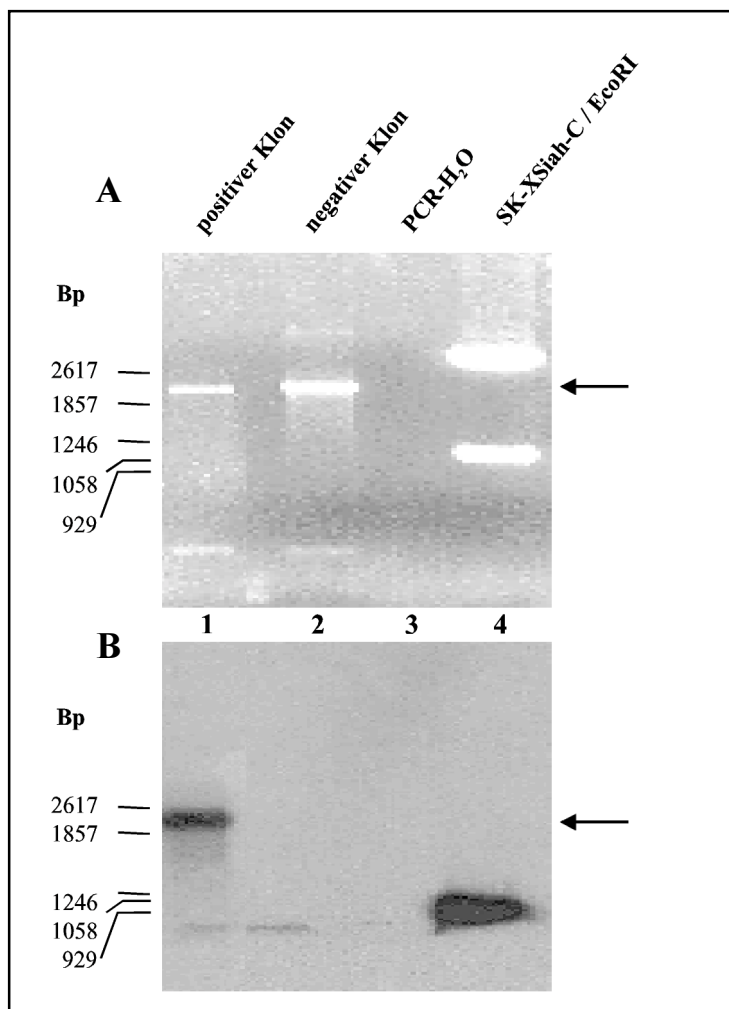


Abb. 6 Isolierung eines 2200 bp großen cDNA-Inserts des Phagenklons 11. (A) Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. (B) Autoradiogramm nach Southern Hybridisierung von A. Als Sonde diente das 189 bp große Fragment des Ursprungsklons XSiah-C. Der Pfeil markiert die Höhe des positiven Phageninserts.

Der isolierte Phagenklon 11 enthält ein 2200 bp großes Insert (Abb. 6 A, Spur 1), das mit der verwendeten Sonde hybridisiert (Abb. 6 B, Spur 1). Zur Kontrolle wurde das Insert eines negativen Klons amplifiziert (Abb. 6 A, Spur 2), dessen Größe zufällig dem des positiven Klons 11 entspricht, jedoch erwartungsgemäß nicht mit der Sonde hybridisiert (Abb. 6 B, Spur 2). Um eine Amplifikation von DNA-Fragmenten aufgrund von Kontaminationen ausschließen zu können, wurde ein PCR-Ansatz ohne Phagen-DNA (mit H₂O) verwendet.

Erwartungsgemäß enthält dieser Kontrollansatz kein PCR-Produkt (Abb. 6 A, Spur 3). Die Spezifität der Southern Blot Analyse wird darüber hinaus durch die Hybridisierung der Sonde mit einem 1200 bp großen Fragment des Plasmids SK-XSiah-2C (Abb. 6 A, Spur 4) nach Restriktion mit *EcoRI* belegt. Dieses Fragment enthält 189 Basenpaare der kodierenden Sequenz von XSiah, die als Sonde verwendet wurden (Abb. 6 B, Spur 4).

Die amplifizierten cDNA-Inserts der beiden positiven Phagenklone wurden nach Gelelution in den pBluescript SK⁺ subkloniert und anschließend sequenziert. In der Abbildung 7 sind die cDNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Phagenklons 11 dargestellt: Das 2200 bp großes Insert von Klon 11 enthält den gesamten offenen Leserahmen von XSiah, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz ein Protein von 313 Aminosäuren kodiert (Abb. 7). Die 939 Nukleotide umfassende kodierende Region ist von einem 5' und 3' untranslatierten Bereich mit 68 bzw. 1000 Nukleotiden flankiert. Letzterer wurde nicht vollständig sequenziert, endet jedoch mit 60 Adeninresten, die wahrscheinlich Teil des Poly(A)-Schwanzes sind.

Der sehr kurze 5' gelegene untranslatierte Bereich der XSiah cDNA enthält kein „in frame“-Stopcodon (Abb. 7). Die Nukleotide um das Startcodon entsprechen der von Kozak (1987, 1999) beschriebenen Konsensussequenz, die bei Vertebraten zur Initiation der Translation entscheidend beiträgt. Demnach müssen sich in der Position -3 vor und in der Position + 4 nach dem Startcodon Purinbasen (A oder G) befinden. Die cDNA-Sequenz von XSiah enthält in der Position -3 ein Guanodin und in der Position + 4 ein Adenosin (Abb. 7, rot markiert). Aufgrund der vorhandenen Kozak-Sequenz in der XSiah cDNA ist anzunehmen, dass die ermittelte kodierende Region tatsächlich dem gesamten Protein entspricht.

Die cDNA des Phagenklons 9 enthält 690 Nukleotide der kodierenden Region, die für die Aminosäuren 84 bis 313 kodieren (Abb. 7, grün markiert). Diesem kodierenden Bereich schließt sich eine 500 Nukleotide umfassende 3' untranslatierte Region an. Die vollständige Übereinstimmung der Sequenz mit der des Ausgangsklons XSiah-C und des Phagenklons 11 zeigt, dass das DNA-Fragment von Klon 9 eine partielle cDNA einer identischen mRNA darstellt.

-68	GGGCCGCGTCGACGGAAGTTCCACCTCCCCGTGTCTCTCCTCGAAGTTCCATGGTTTCAGCAGAAGCGCG																	
1	ATG M	AGC S	CGC R	CCG P	TCC S	TCT S	GCC A	GGA G	CCC P	TGC C	GCT A	AGC S	AAA K	CCC P	TGT C	GGC G	16	
49	AAG K	CAA Q	AAG K	CAG Q	CCG P	CCG P	CCA P	CCA P	CCA P	CCT P	CAC H	GCT A	CCG P	TCG S	TTG L	CCC P	32	
97	GCC A	ACG T	ATT I	TCC S	GGC G	GGA G	CCT P	GGT G	GCG A	TCT S	GCC A	CCT P	CCA P	GCC A	CCG P	ACG T	48	
145	GCA A	GCA A	GCA A	ATC I	ACG T	GGC G	CCA P	CTG L	TCC S	CAG Q	CAG Q	CAC H	CAG Q	GAG E	CTG L	ACG T	64	
193	TCG S	CTG L	TTT F	GAG E	TGT C	CCG P	GTC V	TGT C	TTC F	GAC D	TAT Y	GTC V	CTG L	CCT P	CCT P	ATC I	80	
241	CTG L	CAG Q	TGC C	CAG Q	GCC A	GGA G	CAC H	CTG L	GTG V	TGT C	AAT N	CAA Q	TGC C	CGC R	CAG Q	AAG K	96	
289	CTG L	AGC S	TGT C	TGC C	CCG P	ACT T	TGC C	AGG R	GCC A	TCC S	CTC L	ACC T	CCG P	AGT S	ATT I	CGG R	112	
337	AAC N	CTG L	GCA A	ATG M	GAG E	AAA K	GTG V	GCC A	TCC S	GCT A	GTC V	CTC L	TTC F	CCC P	TGC C	AAG K	128	
385	TAT Y	GCC A	TCT S	ACT T	GGA G	TGC C	TCC S	CTA L	TCT S	CTC L	CAT H	CAC H	ACT T	GAG E	AAG K	CCA P	144	
433	GAG E	CAC H	GAG E	GAC D	ATC I	TGT C	GAA E	TAC Y	CGG R	CCA P	TAC Y	TCC S	TGC C	CCT P	TGT C	CCT P	160	
481	GGA G	GCC A	TCG S	TGT C	AAA K	TGG W	CAG Q	GGA G	TCA S	TTG L	GAA E	AAT N	GTT V	ATG M	CAG Q	CAC H	176	
529	CTT L	ACA T	CAC H	TCC S	CAC H	AAG K	AGC S	ATC I	ACC T	ACC T	CTT L	CAG Q	GGA G	GAA E	GAC D	ATC I	192	
577	GTT V	TTC F	CTT L	GCA A	ACC T	GAT D	ATA I	AAC N	CTG L	CCC P	GGT G	GCT A	GTT V	GAC D	TGG W	GTG V	208	
625	ATG M	ATG M	CAG Q	TAC Y	TGT C	TTT F	AAC N	CAT H	CAT H	TTT F	ATG M	TTG L	GTG V	CTT L	GAG E	AAA K	224	
673	CAG Q	GAG E	AAG K	TAT Y	GAG E	GGA G	CAC H	CAG Q	CAG Q	TTC F	TTT F	GCC A	ATC I	GTC V	CTC L	CTA L	240	
721	ATC I	GGC G	ACA T	CGA R	AAG K	CAA Q	GCC A	GAA E	AAC N	TAT Y	GCC A	TAC Y	AGA R	CTT L	GAA E	CTT L	256	
769	AAT N	GGA G	AAC N	CGG R	AGA R	CGC R	TTG L	ACA T	TGG W	GAA E	GCC A	ACC T	CCG P	AGG R	TCT S	ATC I	272	
817	CAT H	GAT D	GGG G	GTA A	GCT A	GCA A	GCA A	ATC I	ATG M	AAC N	AGT S	GAT D	TGC C	TTA L	GTT V	TTT F	288	
865	GAT D	ACT T	GCA A	ATT I	GCA A	CAC H	TTG L	TTT F	GCA A	GAC D	AAT N	GGA G	AAC N	TTG L	GGC G	ATC I	304	
913	AAT N	GTA V	ACC T	ATT I	TCC S	ACA T	TGT C	TGT C	CCA P	TAA STOP	CCATTTCACATGTTGTCCATAAAGCC						313	
970	TGTTTTGTGATTTCTGTAAAAAAAAAAGTTAGTTATTTTAAATGGCTGTATTTGAATATAGTACAGTTGGCTTTTTTTT																	
1049	TTTTTTTTGTCTAAAAATTGATTTAAAGCATTGTTTTGTAAAGACCTTACATATTTCCCTCAATATATTTTTAACTTT																	
1129	GGGAGTGCCAGATGGGTGTTTACCTTACCTTGACACACCTCTTGCACTTTAAGAGTTCAAGGCTCTATGAACG																	
1207	TGTGAAACATTGTAAGATGACATCATACAAATATTTGTTCTATTTTCTATAAAATGGTTAATGACAGCTTTGATTGT																	
1286	GTAGCGCTCATGTTTAGCATAATCAGAAATCATAACTTCAAATATTGCTCATTGTCTTAAAAACAATCAAAATTTGAC																	
1364	AAATAAGCATTTTCGTGCTTTCTCTTGCACTGACTAAAAATATTATTTTCCCCATAAACGGACTATGGGTAGAACT																	
1442	CATGTGTTCCAGAAGTC CCCCTTTTACTAATTGGGCTCCNGCAG																	

Abb. 7 cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Xenopus Seven in absentia* Homolog (XSiah). Die Zahlen am linken und rechten Seitenrand geben die Positionen der Nukleotide bzw. Aminosäuren im Einbuchstabencode an. Die Sequenz wurde in der NCBI-Genbank unter der Zugangsnummer AF155509 hinterlegt. Die zur Translationsinitiation entscheidenden Purinbasen in der Position – 3 und + 4 der Kozak-Sequenz sind rot hervorgehoben. Der Anfang der Sequenz von Klon 9 ist grün markiert.

3.2 Das *Xenopus* Seven in absentia Homolog ist zu 85 % identisch mit den Säuger Siah-2 Proteinen

Im Gegensatz zu *Drosophila* existieren bei den Säugern verschiedene *Seven in absentia* Varianten, die als *Seven in absentia Homologe* (Siah) bezeichnet werden. In der Maus existieren drei Varianten: Siah-1A, Siah-1B und Siah-2 (Della et al., 1993). Im Menschen sind bislang eine Siah-1-Variante und Siah-2 isoliert worden (Hu et al., 1997). In der Abbildung 8 sind die Aminosäuresequenzen von XSiah (fett gedruckt, Mitte), der Säuger Siah-2 Proteine (oberhalb von XSiah), der Säuger Siah-1 Proteine (unterhalb von XSiah) und des Sina Proteins aus *Drosophila* gegenübergestellt.

Hum Siah-2T..S	.N...S..PP	..QPQHT.S	A..PAA....	AA...S...V	49
M Siah-2T..S	.N...S..PP	..QTPHA.S	A..PAA....	AA...S...V	50
X Siah	MSRPSSAGPC	ASKPCGKQKQ	PP-----PPP	HAPSLPATIS	G-GPGASAPP	45
Hum Siah-1	---RQTATAL	.TGTSKC..S	QRVPAALTGTT	ASNN-----	33
M Siah-1A	---RQTATAL	.TGTSKC..S	QRVPAALTGTT	ASNN-----	33
M Siah-1B	---RQAATAL	STGTSKC..S	QRVPAALTDTT	ASNN-----	33
Sina	..NKINP---	..RREPTAA	AAGAGATGVA	TNT.TSTGS.	SA.NTS..NT	45
Hum Siah-2	.AAAVISG.G	GGGGA..V.P	..H.....	99
M Siah-2	.AAAVISG.G	.GGGAD.V.P	..H.....	100
X Siah	A-----PT	AAAITGPLSQ	QHQLTSLFE	CPVCFDYVLP	PILQCQAGHL	88
Hum Siah-1	---D.A....S....	60
M Siah-1A	---D.A....S....	60
M Siah-1B	---D.A....S....	60
Sina	SSSSSSSLSS	.GGGDAGM.A	---D.....SS....	92
Hum Siah-2	GA..T...T..	149
M Siah-2	GA..T...T..	150
X Siah	VCNQCRQKLS	CCPTCRASLT	PSIRNLAMEK	VASAVLFPCCK	YASTGCSLSL	138
Hum Siah-1	..SN..P..TGP.GNS.....	..S...EIT.	109
M Siah-1A	..SN..P..TGP.GNS.....	..S...EIT.	109
M Siah-1B	..SN..P..TGP.GNS.....	..S...EIT.	109
Sina	..VS..S..TGP.A	-N.....	..N.K....	HSGY..TA..	141
Hum Siah-2A..S..M	..A.....	199
M Siah-2A..S..M	..A.....	200
X Siah	HHTEKPEHED	ICEYRPPYSCP	CPGASCKWQG	SLENVMQHLT	HSKKSITTLQ	188
Hum Siah-1	P...AD..E	L..F.....DA..P..M	..Q.....	159
M Siah-1A	P...A...E	L..F.....DA..P..M	..Q.....	159
M Siah-1B	P...K...E	L..F.....DA..P..M	..Q.....	159
Sina	VY...T...E	T..C...L..	P.DL...M	M.....	191
Hum Siah-2	E.....S..G..	249
M Siah-2	..ET.....S..G..	250
X Siah	GEDIVFLATD	INLPGAVDWV	MMQYCFNHHF	MLVLEKQEKY	EGHQQFFFAIV	238
Hum Siah-1S..GF..	D.....	209
M Siah-1AS..GF..	D.....	209
M Siah-1BS..GF..	D.....	209
SinaS..G..	D.....	241
Hum Siah-2F.....	299
M Siah-2F.....	300
X Siah	LLIGTRKQAE	NYAYRLELNG	NRRRLTWEAT	PRSIHDGVAA	AIMNSDCLVF	288
Hum Siah-1	Q.....	..F.....	H.....E..I.T	259
M Siah-1A	Q.....	..F.....	H.....E..I.T	259
M Siah-1B	Q.....	..F.....	H.....E..I.T	259
Sina	Q...S..E..	..FV.....ME...S	..H.....	291
Hum Siah-2*	324
M Siah-2-Q	325
X Siah	DTAIAHLFAD	NGNLGINVTI	STCCP*	313
Hum Siah-1	..S..Q...EM..*	282
M Siah-1A	..S..Q...EM..*	282
M Siah-1B	..S..Q...EM..*	282
Sina	..S..Q...ELV*	314

Abb. 8 Aminosäuresequenz-Vergleich zwischen *Xenopus* (XSiah), humanen (HumSiah; Hu et al., 1997), murinen (Msiah; Della et al., 1993) und *Drosophila* (Sina; Carthew and Rubin, 1990) *Seven in absentia* Proteinen. Die Aminosäuresequenz des XSiah-2 Proteins ist im Einbuchstabencode angegeben. Identische Aminosäuren in den anderen Siah Proteinen sind mit einem Punkt markiert, Sequenzabweichungen sind angegeben. Für fehlende Aminosäuren wurde ein Strich eingefügt. Die putative RING-Zinkfinger Domäne ist rot umrahmt, die Cystein reiche Sequenz ist blau und das putative Kernlokalisierungssignal (NLS) schwarz unterstrichen.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz von XSiah mit den Säuger Siah Proteinen, so zeigt sich, dass das *Xenopus* Protein die höchste Homologie zu dem Siah-2 Protein der Maus (MSiah-2) und des Menschen (HumSiah-2) mit 85 % Identität aufweist. Das XSiah Protein ähnelt insbesondere im gering konservierten N-Terminus (Position 1 bis 60) am stärksten den Säuger Siah-2 Proteinen. Die wesentlich kürzeren Siah-1 Proteine der Maus (MSiah-1A, MSiah-1B) und des Menschen (HumSiah-1) weisen dagegen im N-Terminus nahezu keine Übereinstimmungen in ihrer Aminosäuresequenz mit XSiah auf. Aufgrund dieser geringen Konservierung im N-Terminus sind die Siah-1 Proteine lediglich zu 67 % identisch mit dem XSiah Protein. Eine vergleichbare Homologie besteht zwischen dem *Xenopus* und dem *Drosophila* Protein mit 66 % Aminosäure-Identität. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von XSiah zu den Siah-2 Proteinen wird das *Xenopus* Seven in absentia Homolog im folgenden als XSiah-2 bezeichnet.

Die Abbildung 9 zeigt schematisch die Proteinstruktur von XSiah-2 im Vergleich zu dem humanen Siah-2 (HumSiah-2). XSiah-2 weist in der hochkonservierten Region (95 % Identität zu HumSiah-2) drei auffällige Bereiche auf: Ein RING-Zinkfinger Motiv vom Typ C3HC4 (rot), eine Cystein reiche Region (blau) und am C-Terminus ein putatives Kernlokalisierungssignal (schwarz).

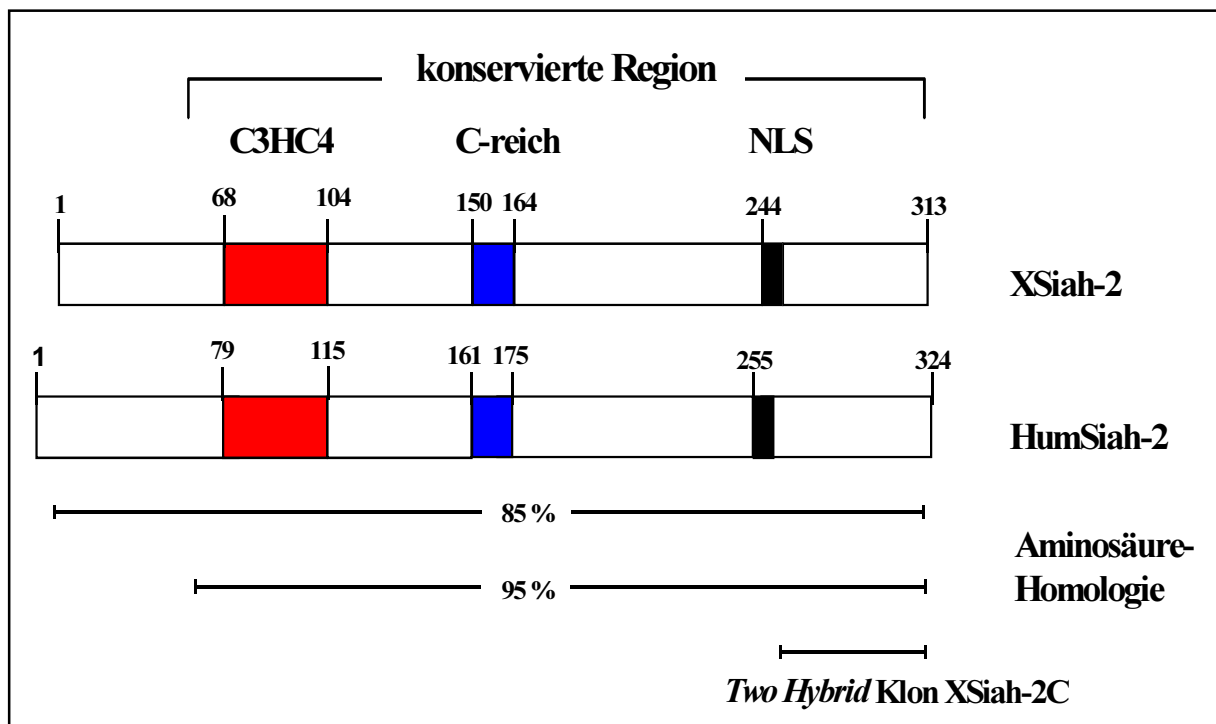


Abb. 9 Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Siah-2 aus *Xenopus* und Mensch. Das putative RING-Zinkfinger Motiv ist rot, die Cystein reiche Sequenz ist blau und das putative Kernlokalisierungssignal (NLS) schwarz unterlegt.

Das RING-Finger Motiv, ursprünglich gefunden im Proteinprodukt des menschlichen Gens RING-1 (Really Interesting New Gene 1), besteht aus einer einzigen linearen Abfolge konservierter Cystein- und Histidinresten entsprechend der Konsensussequenz Cys-X₂-Cys-X₉₋₃₉-Cys-X₁₋₃-His-X₂₋₃-Cys/His-X₂-Cys-X₄₋₄₈-Cys-X₂-Cys, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann (zur Übersicht: Freemont, 2000). Strukturelle und biophysikalische Untersuchungen belegen eine Bindung des RING-Fingers an zwei Zinkatomen (zur Übersicht: Saurin et al., 1996). RING-Finger Domänen sind in einer Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Proteine gefunden worden. Neuere Untersuchungen weisen auf eine Vermittlung von Ubiquitinierungsereignissen als eine gemeinsame Funktion der RING-Finger Domäne hin (zur Übersicht: Freemont, 2000). Hinsichtlich der Säuger Siah Proteine konnte eine Ubiquitin vermittelte Proteolyse von Interaktionspartnern (z.B. DCC, BAG-1), nachgewiesen werden, bei der die RING-Finger Domäne essentiell ist (Hu et al., 1999). Die Aminosäuren im RING-Zinkfinger Motiv von XSiah-2 sind vollständig identisch mit denen des murinen und humanen Siah-2 Proteins (Abb. 8, roter Rahmen). Inwieweit DCoH/PCD als putativer Interaktionspartner ebenfalls ein Zielprotein einer Ubiquitin vermittelten Proteolyse durch XSiah-2 darstellt, ist Gegenstand nachfolgender Untersuchungen dieser Arbeit.

Die Bedeutung einer weiteren, weiter C-terminal gelegenen, Cystein reichen Sequenz (Abb. 8 und 9, blau gekennzeichnet) im hochkonservierten Bereich von XSiah-2 ist unbekannt.

XSiah-2 wie auch alle bekannten Siah Proteine verfügt darüber hinaus über ein putatives Kernlokalisierungssignal am C-Terminus (RK-RRR), das bislang noch nicht funktionell untersucht wurde.

3.3 XSiah-2 kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 34 kDa

Die Sequenzdaten weisen daraufhin, dass XSiah-2 ein Protein bestehend aus 313 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 34 kDa kodiert. Um zu überprüfen, ob die isolierte cDNA tatsächlich in ein Proteinprodukt mit entsprechendem Molekulargewicht translatiert wird, wurde eine gekoppelte in vitro Transkription / Translation unter Verwendung eines Retikulozytenlysats und radioaktiv markierten Methionin durchgeführt. Als DNA-Matrize diente das Plasmid SK/XSiah-2, das die gesamte 2200 bp große cDNA enthält. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Retikulozytenlysats konnte ein Polypeptid im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 34 kDa

autoradiographisch detektiert werden (Abb. 10, Spur 2). Dieses Translationsprodukt wurde erwartungsgemäß im Ansatz ohne DNA nicht synthetisiert (Spur 3).

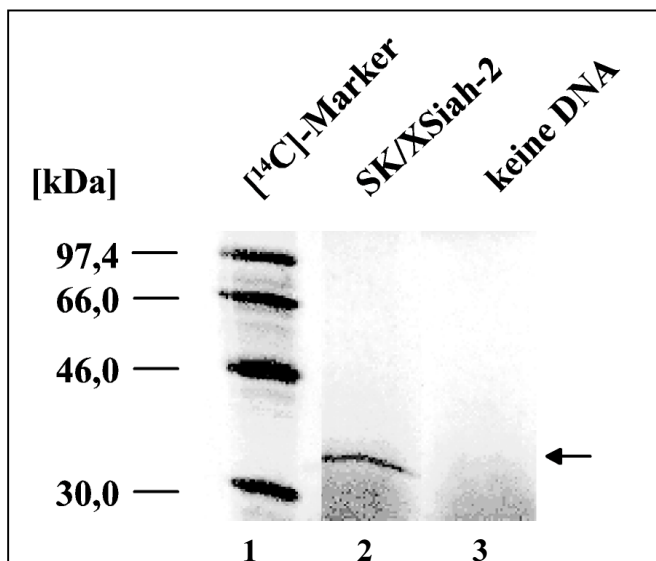


Abb. 10 XSiah-2 kodiert ein 34 kDa großes Protein. Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Retikulozytenlysaten. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Gemisch verschiedener [14C]-methylierter Markerproteine verwendet. Der Pfeil markiert die Position des Translationsproduktes von XSiah-2.

Insgesamt wurden nur geringe Mengen des XSiah-2 Proteins detektiert. Wie spätere Zelltransfektionen zeigen, sind bei einer C-terminalen Verkürzung des XSiah-2 Proteins wesentlich größere Proteinmengen nachweisbar (Abb. 18), so dass möglicherweise eine erhöhte Instabilität des XSiah-2 Proteins für diese geringe Proteinmengen verantwortlich ist.

3.4 Der C-Terminus von XSiah-2 ist ausreichend und notwendig für die Interaktion mit DCoH/PCD

Um zu überprüfen, ob das vollständige XSiah-2 Protein entsprechend dem C-terminalen Fragment XSiah-C (Ursprungsklon) ebenfalls mit dem *Xenopus* DCoH/PCD interagiert, wurde eine *Two Hybrid* Analyse durchgeführt. Zum besseren Verständnis dieser Analyse wird im folgenden zunächst der theoretische Hintergrund des *Two Hybrid* Systems dargestellt.

Das *Two Hybrid* System ist eine genetische Methode für den *in vivo*-Nachweis physikalischer Protein-Protein-Interaktionen in Hefe (Fields and Song, 1989). Es nutzt die Domänenstruktur von Transkriptionsfaktoren, die wie beispielsweise das Gal4 Protein der Bäckerhefe aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Transaktivierungsdomäne (AD) zusammengesetzt sind. Die Domänen des Gal4 Transkriptionsfaktors müssen nicht kovalent verbunden sein, sondern können durch die Interaktion zweier Proteine zusammengebracht werden. Um dieses System zu benutzen, müssen zwei Hybrid Proteine hergestellt werden: In einem Fall wird ein Protein X mit der DNA-Bindungsdomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors der Hefe fusioniert

(Gal4-DBD-X-Fusion), im anderen ein Protein Y mit der Gal4 Transaktivierungsdomäne (Gal4-AD-Y-Fusion). Beide Proteine werden in einem *S. cerevisiae*-Stamm exprimiert, der ein Reportergen (LacZ oder HIS3) unter der Kontrolle eines entsprechenden Gal-4 Promotorelementes (UAS) trägt. Bei alleiniger Expression der Gal4-DBD-X-Fusion (Abb. 11 A) wird das Reportergen nicht transkribiert. Dieses Fusionsprotein kann zwar das Gal4 Promotorelement binden, transaktiviert jedoch nicht das nachgeschaltete Reportergen, da es keine Transaktivierungsdomäne enthält. Eine gleiche Situation liegt bei der alleinigen Expression der Gal4-AD-Y-Fusion vor (Abb. 11 B): Das Gal4-AD-Y-Fusionsprotein besitzt zwar eine Transaktivierungsdomäne, kann jedoch aufgrund der fehlenden Gal4-DNA-Bindungsdomäne nicht an das Gal4 Promotorelement binden und ist so nicht in der Lage, das Reportergen zu transkribieren. Nur wenn beide Domänen nach Koexpression durch eine Interaktion der Fusionsanteile (X und Y) in räumliche Nähe gebracht werden, werden die Reportergene (LacZ und HIS3) aktiviert (Abb. 11 C).

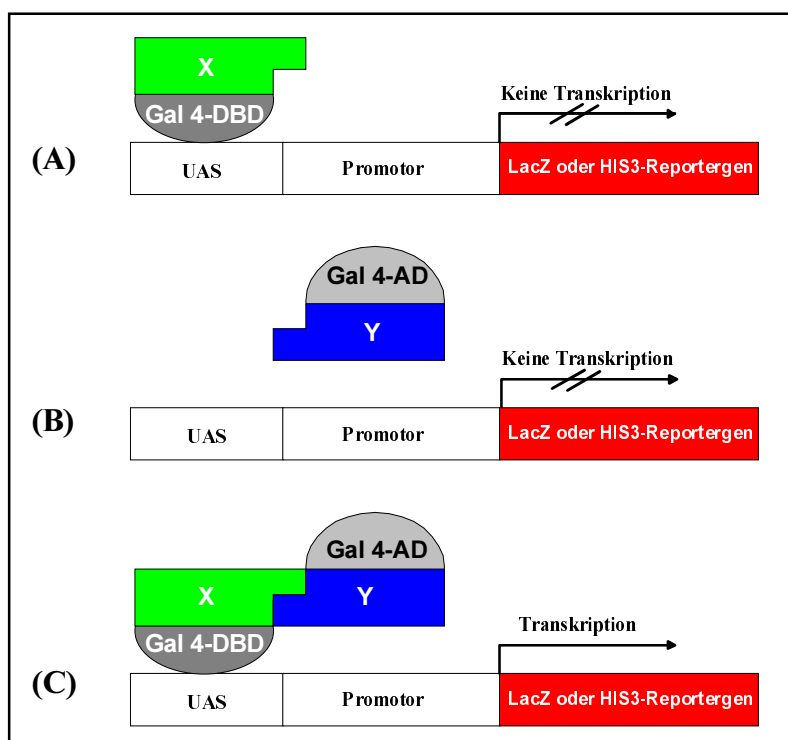


Abb. 11 Das Hefe *Two Hybrid* System, eine genetische Methode zum Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen (X und Y). Schematische Darstellung zum methodischen Prinzip des Hefe *Two Hybrid* Systems. UAS: Upstream Activator Sequence.

Die Transaktivierung des LacZ-Gens (β -Galaktosidase) ist durch eine Blaufärbung der Hefezellen nachweisbar, die durch die enzymatische Umsetzung eines Farbstoffes durch die β -Galaktosidase hervorgerufen wird. Die Aktivierung des zweiten Reportergens, HIS3 (Imidazolglyzerinphosphat-Dehydratase), wird dadurch erkennbar, dass die Hefezellen auf Histidin freien Nährmedien wachsen können (Histidin-Prototrophie).

Für die Analyse der Interaktion zwischen XSiah-2 und DCoH/PCD wurden Expressionsvektoren mit einer Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusion und einer Gal4-AD-XSiah-2-Fusion hergestellt. Zusätzlich zum Wildtyp XSiah-2 Protein wurden zwei Deletionsmutanten des XSiah-2 als AD-Fusionen erstellt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit DCoH/PCD zu binden, untersucht: Zum einen wurde die Mutante XSiah-2 Δ C verwendet. Dieses C-terminal verkürzte Protein entspricht einer natürlichen *Drosophila* Mutante, der die R7-Photorezeptorzellen fehlen (Carthew und Rubin, 1990). Zum anderen wurde eine Mutante von XSiah-2 (XSiah-2 Δ R) untersucht, bei der die RING-Finger Domäne deletiert wurde. Dieses mutierte Protein entspricht einer künstlichen, humanen Siah-2 Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, die Ubiquitin vermittelten Proteolyse des Interaktionspartners DCC zu induzieren (Hu und Fearon, 1999).

Um zunächst zu kontrollieren, ob eines der Fusionsproteine alleine das LacZ- oder das HIS3-Gen aktivieren kann, wurden Hefezellen (Hefestamm HF7C) mit einzelnen Expressionsvektoren transformiert. Bei einer alleinigen Expression der Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusion oder der Gal4-AD-XSiah-2-Fusionen konnte weder eine Aktivierung des LacZ- noch des HIS3-Reportergens beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig konnte eine Aktivierung der Reportergene nachgewiesen werden, wenn die Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusion mit dem leeren Gal4-AD-Expressionsvektor (ohne Fusionsanteil) oder eine der Gal4-AD-XSiah-2-Fusionen mit dem leeren Gal4-DBD-Expressionsvektor (ohne Fusionsanteil) koexprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu diesen Kontrollansätzen führte eine Koexpression der Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusion mit den Gal4-AD-Fusionen Gal4-AD-XSiah-wt (Abb.12 A) und Gal4-AD-XSiah-2C (Abb.12 B) zur Aktivierung beider Reportergene. Entsprechende Kotransformanten wachsen auf Selektionsmedien ohne Histidin und zeigen eine deutliche Blaufärbung (Abb.12 A und B). Demnach interagiert das *Xenopus* DCoH/PCD mit XSiah-2-wt und mit XSiah-2C. Diese Interaktionen rekonstituiert also entsprechend der in Abbildung 11 C dargestellten Situation funktionelle Gal4-Aktivatorproteine. Dagegen zeigten Doppeltansformanten mit der Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusion und je einer Gal4-AD-Fusion, Gal4-AD-XSiah-2 Δ C (Abb.12 C) oder Gal4-AD-XSiah-2 Δ R (Abb.12 D), weder Histidin-Prototrophie noch eine β -Galaktosidase-Aktivität.

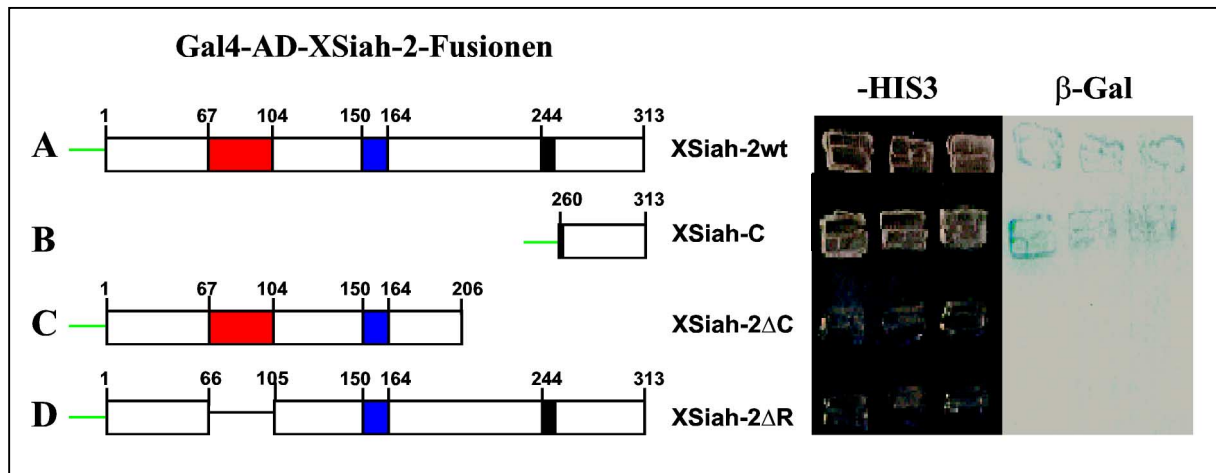


Abb. 12 XSiah-2 interagiert mit DCoH/PCD im Hefe *Two Hybrid* System. Je drei unabhängige Doppeltransformanten des Hefetammes HF7C mit dem Gal4-DBD-DCoH/PCD-Fusionskonstrukt und einer der vier Gal4-AD-XSiah-2-Fusionskonstrukten **(A)** XSiah-2wt, **(B)** XSiah-C, **(C)** XSiah-2ΔC und **(D)** XSiah-2ΔR wurden hinsichtlich ihrer Histidin-Prototrophie (-HIS 3, Histidin-Mangelmedium) und β-Galaktosidase-Aktivität (β-Gal, Blaufärbung) untersucht. Die verschiedenen Gal4-AD-XSiah-2-Fusionen sind links schematisch dargestellt, wobei die aminoterminal fusionierte Gal4-AD-Domäne nur als grüne Linie gekennzeichnet ist. Die putative RING-Finger Domäne ist rot, die Cystein reiche Sequenz ist blau und das putative Kernlokalisationssignal (NLS) von XSiah-2 schwarz umrahmt.

Die Ergebnisse bestätigen die Interaktion des *Xenopus* DCoH/PCD mit dem C-Terminus des XSiah-2 Proteins. Dieser Proteinanteil, bestehend aus 53 Aminosäuren, ist ausreichend und zugleich notwendig für die Interaktion zwischen beiden Faktoren. Eine Deletion dieses Bereiches, wie die Analyse mit der XSiah-2ΔC Mutante zeigt, führt zu einem Verlust der Interaktion. Überraschenderweise führt die Deletion der RING-Finger Domäne (Aminosäure 67 bis 104; Abb. 12, rot markiert) des XSiah-2 Proteins ebenfalls zum Verlust der Interaktion. In einer Sequenzierung des entsprechenden Expressionsvektors pGAD-XSiah-2ΔR wurden keine Mutationen gefunden. Möglicherweise verändert diese Deletion die Proteinstruktur so, dass eine Interaktion verhindert wird.

3.5 XSiah-2 wird wie das *Xenopus* DCoH/PCD maternal exprimiert

Um erste Anhaltspunkte zur möglichen Bedeutung des *Xenopus* Seven in absentia Homologen in der Embryogenese zu erhalten, wurde dessen zeitliches und räumliches Expressionsprofil untersucht. Das zeitliche Expressionsprofil wurde zunächst mittels RT-PCR unter Verwendung von Gesamt-RNA verschiedener Entwicklungsstadien von *Xenopus* erstellt (Abb. 13).

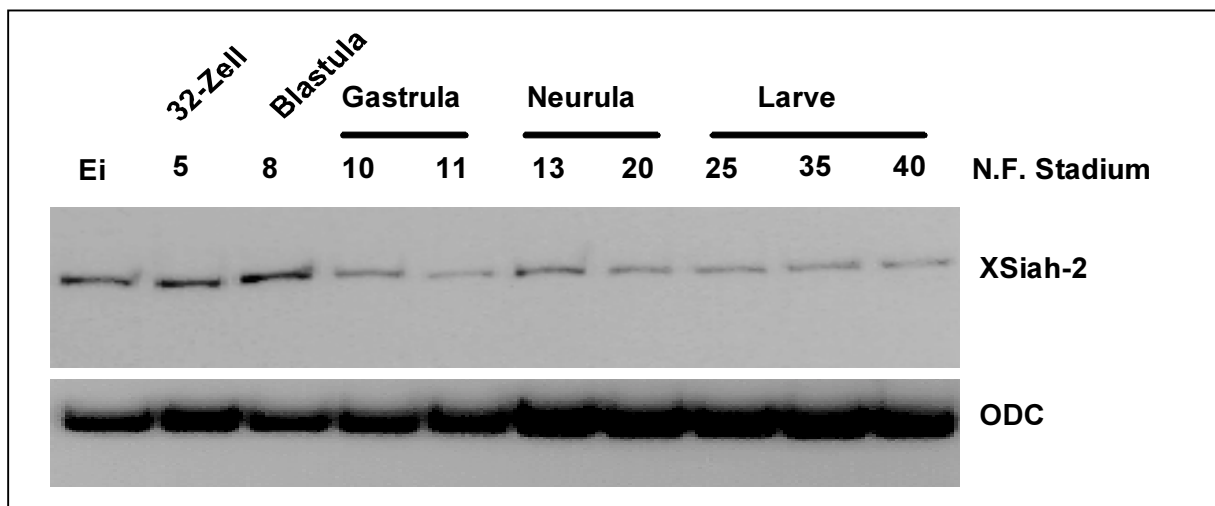


Abb. 13 XSiah-2 Transkripte sind im Ei und in späteren Embryonen von *Xenopus* nachweisbar. Autoradiographischer Nachweis spezifischer RT-PCR Produkte des *Xenopus* Seven in absentia Homologen 2 Transkriptes (XSiah-2) aus Gesamt-RNA verschiedener Entwicklungsstadien von *Xenopus*. Als interne Kontrolle diente die RT-PCR der ubiquitär exprimierten Ornithin-Decarboxylase (ODC). Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte nach Nieuwkoop und Faber (1975).

Wie die Abbildung 13 zeigt, ist das XSiah-2 Transkript bereits im unbefruchteten Ei mittels RT-PCR nachweisbar (Spur 1) und liegt somit maternal vor. Das XSiah-2 Transkript ist darüber hinaus in allen untersuchten Entwicklungsstadien (bis schwimmender Larve, Stadium 40) von *Xenopus* vorhanden. Im Rahmen dieser semi-quantitativen Analyse sind keine bemerkenswerten Unterschiede in der Expressionsstärke des XSiah-2 Gens zwischen den einzelnen Stadien zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass XSiah-2 wie dessen Interaktionspartner DCoH/PCD maternal exprimiert wird.

3.6 XSiah-2 wird im embryonalen Auge und im Rückenmark exprimiert

Um festzustellen, in welchen embryonalen Geweben XSiah-2 während der Entwicklung von *Xenopus* exprimiert wird, wurden *Whole Mount in situ* Hybridisierungen an *Xenopus* Embryonen durchgeführt (Abb. 14).

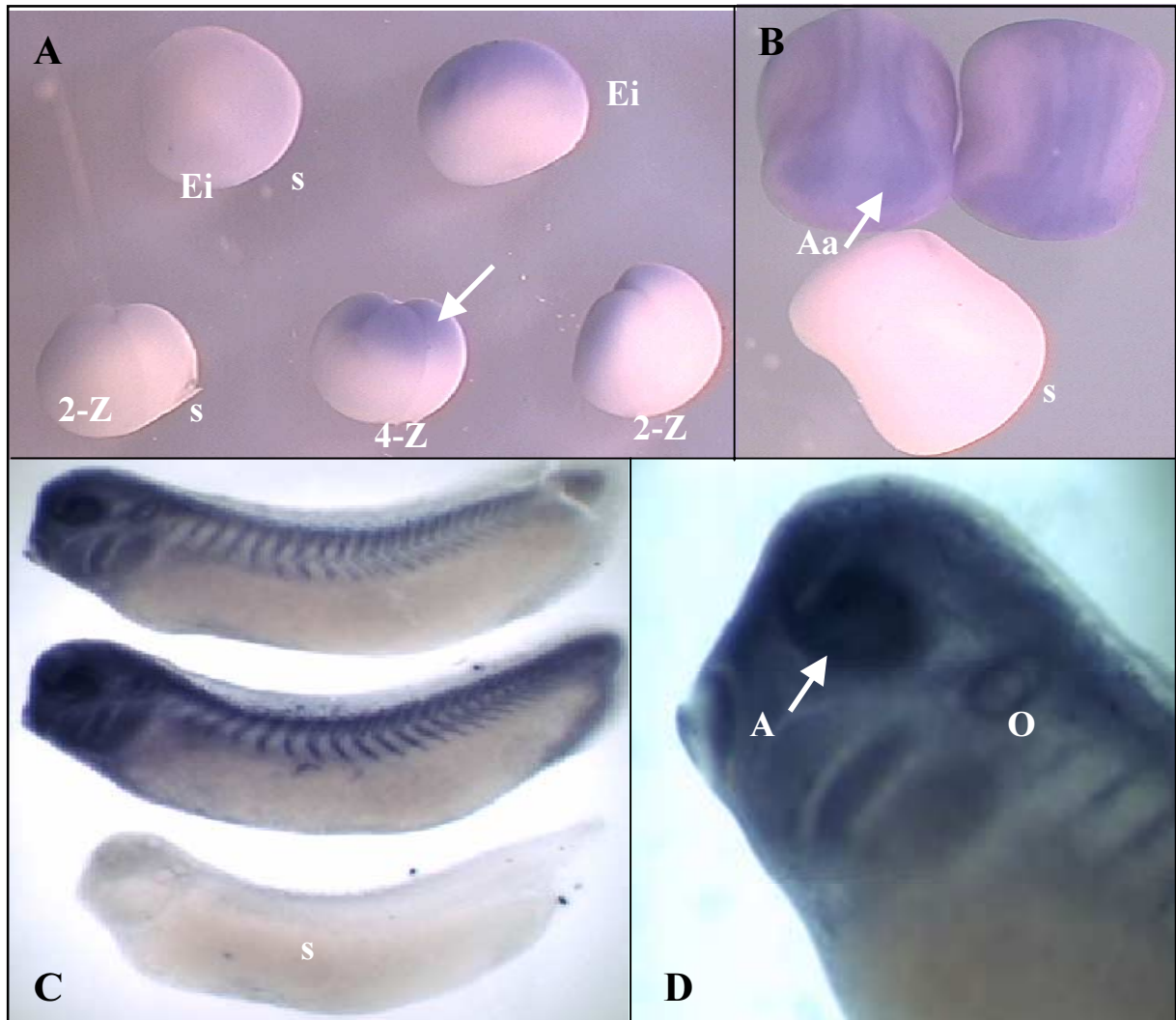


Abb. 14 XSiah-2 wird im embryonalen Auge exprimiert. Nachweis des XSiah-2 Transkriptes in *Xenopus* Embryonen (Albino) mittels *Whole Mount in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten XSiah-2 Antisense RNA-Sonde nach Harland (1991). Der Nachweis der hybridisierten RNA erfolgte immunologisch mit Hilfe eines enzymgekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpers, der nach entsprechendem Substratumsatz die Lokalisation von XSiah-2 Transkripten durch eine Blaufärbung anzeigt. Zur Kontrolle dienten Embryonen, bei denen eine Digoxigenin markierte XSiah-2 Sense RNA-Sonde eingesetzt wurde. Diese Kontrollen sind mit *s* gekennzeichnet. **(A)** Unbefruchtetes Ei, Zwei-, Vier-Zell Embryonen. **(B)** Neurulae, Stadium 22. **(C)** 2 Tage alte Larve, Stadium 30. **(D)** Vergrößerter Ausschnitt der Kopfreion der oberen Larve aus C. Die Pfeile markieren Orte starker XSiah-2 Expression. **Aa:** Augenanlage, **A:** Auge, **O:** Ohr-Vesikel, **2-Z:** Zwei-Zellstadium, **4-Z:** Vier-Zellstadium.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RT-PCR Analyse ist das XSiah-2 Transkript bereits in der unbefruchteten Eizelle nachweisbar (Abb. 14 A rechts oben). Das maternal

vorliegende Transkript konzentriert sich im animalen Bereich der unbefruchteten Eizelle sowie des Zwei- und Vierzell-Embryos (Abb. 14 A, rechts unten). Die Inkubation von Embryonen mit einer Digoxigenin markierten Sense RNA-Sonde (s) diente zur Kontrolle und führte zu keiner Färbung (Abb. 14 A, links). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung wird XSiah-2 überwiegend im anterioren Teil (Augenanlage) und entlang der Neuralleisten des Embryos exprimiert (Abb. 14 B, oben). In 2-3 Tage alten schwimmenden Larven (Stadium 30-39) ist das XSiah-2 Transkript in den kranialen Neuralstrukturen, insbesondere im gesamten Auge, sowie entlang des Rückenmarks mit entspringenden Spinalnerven nachweisbar (Abb. 14 C, oben und D).

Zur Überprüfung dieser differentiellen Expression wurde eine weitere RT-PCR Analyse durchgeführt. Hierzu wurden *Xenopus* Larven (Stadium 39) in fünf Teile (Abb. 15, unten) zerlegt. Zum semi-quantitativen Nachweis des XSiah-2 Transkripts in den verschiedenen Körperteilen wurden gleiche RNA-Mengen zur RT-PCR eingesetzt.

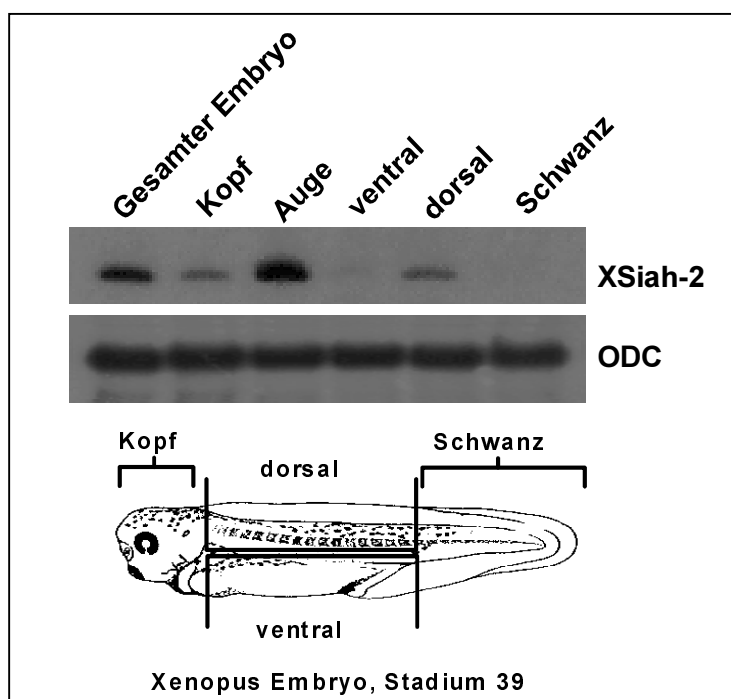


Abb. 15 RT-PCR Analyse zum Nachweis des XSiah-2 Transkripts in verschiedenen Körperteilen von *Xenopus* Larven Autoradiographischer Nachweis spezifischer RT-PCR Produkte des *Xenopus Seven in absentia* Transkriptes (XSiah-2) aus Gesamt-RNA verschiedener Körperteile einer 3 Tage alten *Xenopus* Larve (Stadium 39). Als Kontrolle diente die RT-PCR der ubiquitär exprimierten Ornithin-Decarboxylase (ODC). Zur RT-Reaktion wurden gleiche RNA-Mengen eingesetzt.

Es zeigte sich, dass XSiah-2 Transkripte überwiegend im Auge und im gesamten Embryo vorhanden sind (Abb. 15). Eine geringere Expression ist im Kopf und im dorsalen Mittelstück (Rückenmarksbereich) der untersuchten Larven nachweisbar. Im ventralen Mittelstück (Bereich der inneren Organe) konnten keine Transkripte detektiert werden. Diese RT-PCR Analyse bestätigt die Ergebnisse der *Whole Mount in situ* Hybridisierungen: XSiah-2 wird überwiegend im Auge und im Rückenmarksbereich exprimiert. Demnach korreliert die

Expression von XSiah-2 im Auge teilweise mit DCoH/PCD, das auch in einem Teil des Auges, dem pigmentierten Epithel exprimiert wird (Pogge von Strandmann, 1995). So könnte eine kooperative Aktivität von XSiah-2 und DCoH/PCD gerade in diesem Zelltyp von Bedeutung sein.

3.7 Das XSiah-2 Protein ist nach Transfektion überwiegend im Zytoplasma von 293-Zellen nachweisbar

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von XSiah-2 und DCoH/PCD im Ei, in den ersten Teilungen und im Auge übereinstimmt. Es wurde nun überprüft, ob das XSiah-2 Protein nach Transfektion nachweisbar ist und möglicherweise mit DCoH/PCD subzellulär kolokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzanalysen in transfizierten Gewebekultur-Zellen durchgeführt. Es wurden Expressionskonstrukte, die ein Histidin-(6x)-XSiah-2 Fusionsprotein bzw. ein Myc-DCoH/PCD Fusionsprotein kodieren, transient in die embryonale Nierentumor-Zelllinie 293 transfiziert. Der subzelluläre Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit monoklonalen Anti-Histidin-Antikörpern bzw. Anti-Myc-Antikörpern und einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundär-Antikörper (Abb. 16).

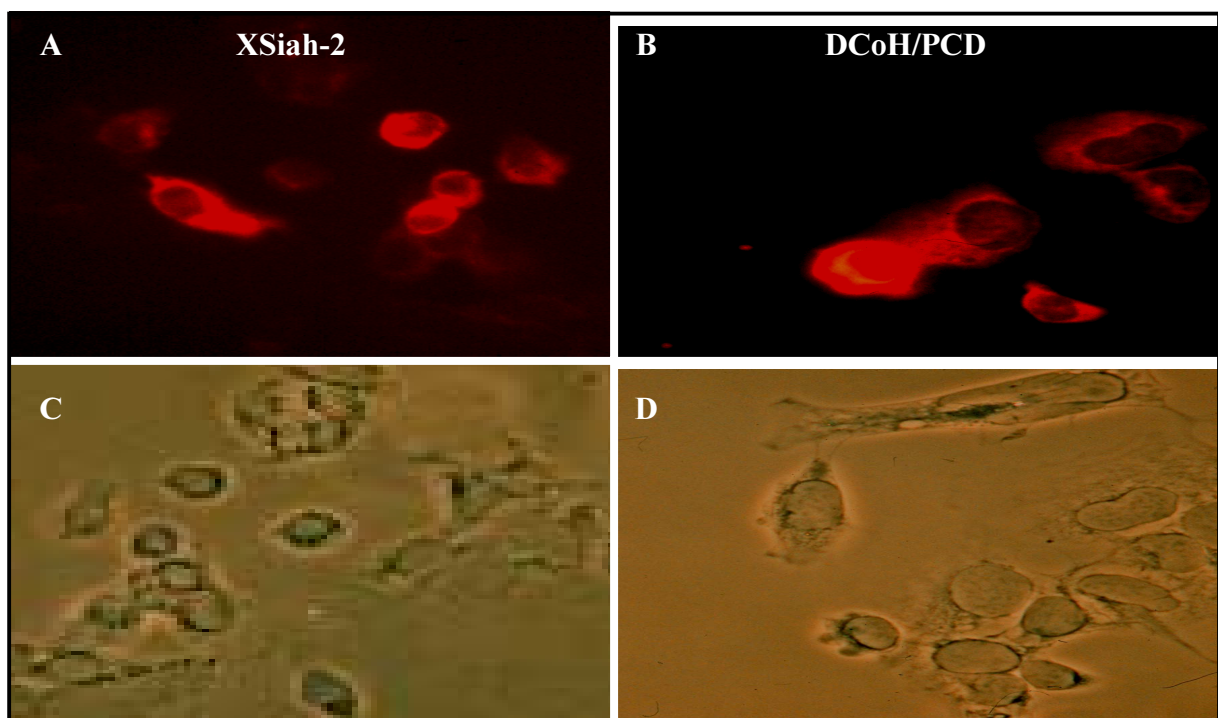


Abb. 16 Nachweis von His-XSiah-2 und Myc-DCoH/PCD nach Transfektion in 293-Zellen. Immunfluoreszenzmikroskopische (A, B) und Phasenkontrast-Aufnahmen (C, D) von embryonalen Nierentumorzellen 293, die mit His-XSiah-2-wt (A, C) oder mit Myc-DCoH/PCD (B, D) transfiziert wurden.

Der Vergleich der Fluoreszenz-Aufnahmen (Abb. 16 A und B) mit den Phasenkontrast-Aufnahmen (Abb. 16 C und D) zeigt, dass sowohl His-XSiah-2-wt als auch das Myc-DCoH/PCD überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert sind, da die Zellkerne der transfizierten Zellen größtenteils von der Fluoreszenz ausgespart sind.

Die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des XSiah-2 zeigte bereits, dass das putative Kernlokalisierungssignal im C-Terminus nach Transfektion in dieser Zelllinie nicht verwendet wird. Um den Einfluß des C-Terminus auf die subzelluläre Verteilung des XSiah-2 Proteins zu analysieren, wurde ein entsprechendes Konstrukt mit dem carboxyterminal verkürzten His-XSiah-2 Δ C Fusionsprotein in 293-Zellen transfiziert (Abb. 17).

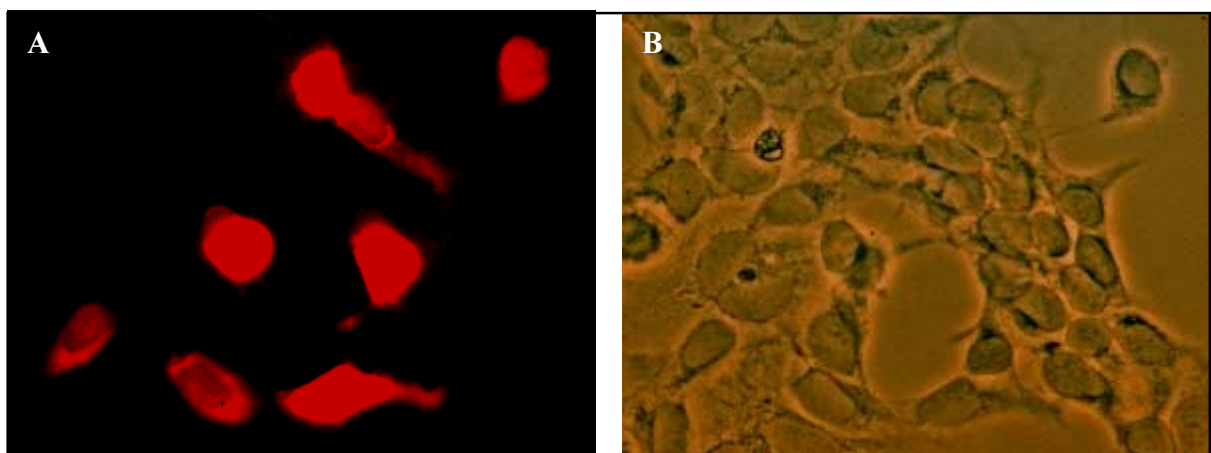


Abb. 17 His-XSiah-2 Δ C ist sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von embryonalen Nierentumor-Zellen 293, die mit der Deletionsmutante His-XSiah-2 Δ C transient transfiziert wurden. Die Detektion des rekombinaten Proteins erfolgte mit Hilfe monoklonaler Anti-Histidin-Antikörpern, deren Bindung mit einem CY3 gekoppelten Sekundär-Antikörper nachgewiesen wurde. **(A)** Fluoreszenz-Aufnahme. **(B)** Phasenkontrast-Aufnahme.

Wie die Abbildung 17 dokumentiert, ist das carboxyterminal verkürzte His-XSiah-2 Δ C Protein zu gleichen Anteilen nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert. Die subzelluläre Verteilung des His-XSiah-2 Δ C Proteins ist somit verändert. Insgesamt ist die Immunfluoreszenz des His-XSiah-2 Δ C-Proteins (Abb. 17 A) im Vergleich zum Wildtyp-Protein His-XSiah-2 (Abb. 16 A) wesentlich stärker. Eine Western Blot Analyse der Zell-Lysate bestätigt die stärkere Expression des verkürzten Proteins (Abb. 18).

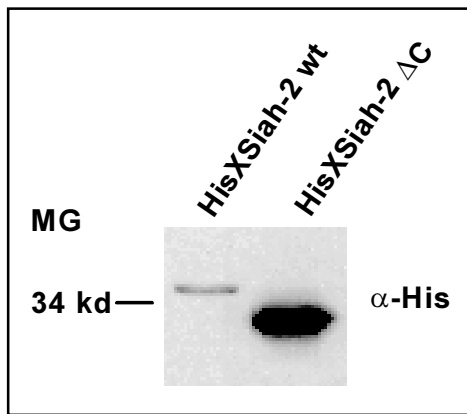


Abb. 18 Das C-terminal verkürzte XSiah-2-ΔC Protein wird wesentlich stärker als das Wildtyp-Protein exprimiert. Western Blot Analyse von Zell-Lysaten His-XSiah-2-wt und His-XSiah-2-ΔC transfizierter 293-Zellen. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Der immunologische Nachweis der Histidin(6x) Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Histidin-Antikörpers und mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper unter Verwendung des ECL-Systems.

Trotz gleicher Mengen transfizierter DNA wird His-XSiah-2-ΔC (Abb. 18, Spur 2) wesentlich stärker als das Wildtyp-Protein (Spur 1) exprimiert. Möglicherweise bedingt diese sehr starke Überexpression eine Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle. Die teilweise nukleäre Lokalisation von His-XSiah-2-ΔC ist daher vermutlich das Ergebnis der starken Expression.

Das putative Kernlokalisierungssignal im C-Terminus von XSiah-2 wird also in 293-Zellen nicht verwendet: His-XSiah-2 ist wie Myc-DCoH/PCD überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Diese subzelluläre Kolo-kalisation ist eine Voraussetzung dafür, dass beide Faktoren kooperativ in Zellen wirken können.

3.8 DCoH/PCD ist kein Zielprotein einer XSiah-2 vermittelten Degradation

Für das *Drosophila* Seven in absentia (Sina) sowie für die homologen Säuger Siah-2 Proteine wurde gezeigt, dass sie die Fähigkeit besitzen, die Proteolyse ihrer Interaktionspartner zu induzieren (Li et al., 1997; Hu et al., 1997). Diese posttranslationale Regulation wird über das Ubiquitinierungssystem vermittelt, an dem offensichtlich die RING-Finger Domäne der Proteine essentiell ist. Diese stark konservierte Proteindomäne interagiert mit dem Ubiquitin konjugierenden Enzym (Ubc), das die Bindung des Ubiquitins als Abbausignal an die entsprechenden Zielproteine initiiert (Lorick et al., 1999).

Um zu überprüfen, ob das *Xenopus* Homolog (XSiah-2) ebenfalls die Fähigkeit besitzt, eine Degradation des Interaktionspartners DCoH/PCD zu vermitteln, wurden Western Blot Analysen von Zell-Lysaten aus kotransfizierten 293-Zellen durchgeführt (Abb. 19). Diese Zellen wurden mit einer konstanten Menge (1µg) eines Myc-DCoH/PCD kodierenden

Expressionsvektors allein (Abb. 19, Spur 2) oder zusammen mit steigenden Mengen eines XSiah-2 Expressionsvektors (Abb. 19, Spur 3-7) kotransfiziert.

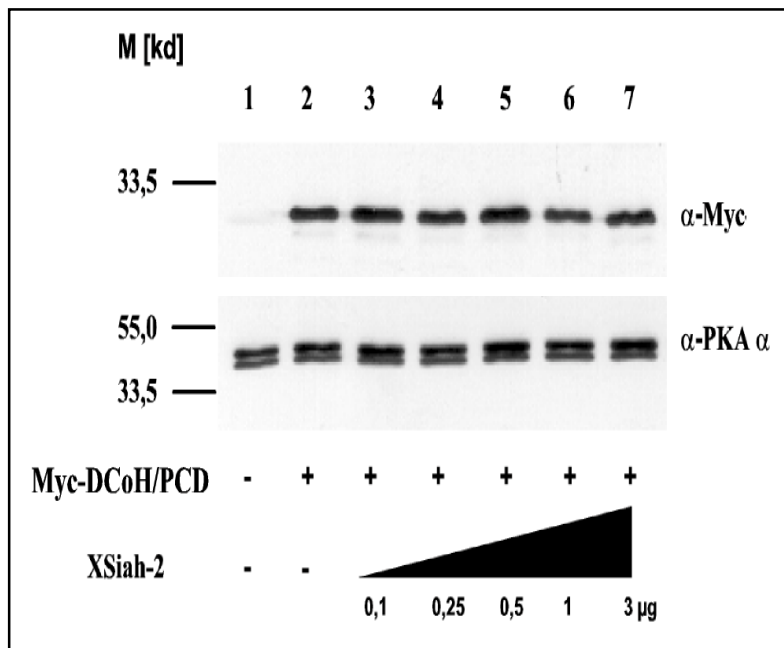


Abb. 19 Eine XSiah-2 vermittelte Proteolyse des Myc-DCoH/PCD ist nicht nachweisbar. Western Blot Analyse von Zell-Lysaten aus Myc-DCoH/PCD und XSiah-2-wt kotransfizierten 293-Zellen. Es wurden jeweils 20 μg Protein aufgetragen. Der immunologische Nachweis des Myc-DCoH/PCD Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Myc-Antikörpers und mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper unter Verwendung des ECL-Systems. Um die Auftragung gleicher Proteinmengen zu bestätigen, wurde der Blot anschließend mit einem polyclonalen Antikörper gegen die α-Untereinheit der menschlichen Proteinkinase A (PKAα) inkubiert.

Die Proteinmenge des Myc-DCoH/PCD ändert sich jedoch trotz steigender Mengen kotransfizierter XSiah-2-DNA (0,1 – 3 μg) nicht. Dies zeigt, dass das rekombinante Myc-DCoH/PCD kein Zielprotein einer XSiah-2 vermittelten Degradation ist.

3.9 Die Überexpression von XSiah-2 in *Xenopus* führt zu Augendefekten

Eine sehr effiziente Methode, um die Funktion eines in *Xenopus* unbekannten Faktors wie dem XSiah-2 in der Embryonalentwicklung zu analysieren, stellt die Mikroinjektion *in vitro* synthetisierter mRNA dar (Moore and Guille, 1999). Die durch die RNA-Mikroinjektion hervorgerufene Überexpression eines Faktors induziert in vielen Fällen Phänotypen, die Rückschlüsse auf die Funktion des Faktors zulassen. Aus diesem Grund wurde *in vitro* synthetisierte XSiah-2 mRNA in eine Blastomere eines Zwei-Zell Embryos injiziert. Die uninjizierte Seite der *Xenopus* Embryonen diente bei der Auswertung des Phänotyps als interne Vergleichskontrolle. Zur Selektion der positiv injizierten Embryonen wurde die *in vitro* synthetisierte mRNA des **Green Fluorescence Protein 2** (GFP2) koinjiziert. Neurulae mit einseitiger GFP-Fluoreszenz wurden aussortiert und phänotypisch bis zum Entwicklungsstadium 40 (schwimmende Larve) analysiert.

Abbildung 20 zeigt, dass die Überexpression von XSiah-2 zu Defekten des Auges führt. Die einseitig fluoreszierenden Embryonen (Abb. 20 A und B) zeigen auf der injizierten Seite verkleinerte Augen (Abb. 20 C und D, Pfeilköpfe). Eine genauere histologische Analyse zeigte, welche Teile des Auges betroffen sind. Wie der Longitudinalschnitt (Abb. 20 E) einer injizierten Larve (Stadium 40) exemplarisch zeigt, resultiert die Reduktion der Augengröße aus einer grundsätzlichen Verkleinerung aller Strukturen. Charakteristische Bestandteile des Vertebraten-Auges wie das pigmentierte Epithel (PE), Retina (RE) und die Linse (L) sind auf der injizierten Seite (Abb. 20 E, rechts) morphologisch gut zu unterscheiden, jedoch im Vergleich zur uninjizierten Kontrollseite (links) in ihrer Größe reduziert.

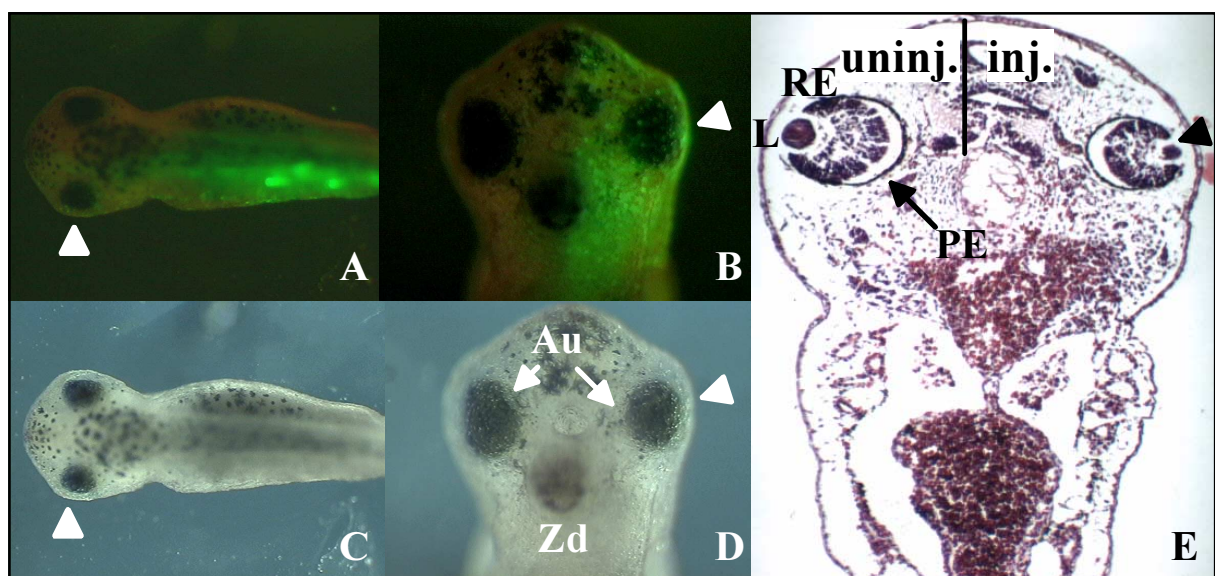


Abb. 20 Die Überexpression von XSiah-2 in *Xenopus* Embryonen führt zu einer Reduktion der Augengröße. Zwei-Zell Embryonen wurde in einer Blastomere *in vitro* synthetisierte XSiah-2 mRNA und GFP mRNA koinjiziert. Die Verteilung des ektopisch exprimierten XSiah-2 Proteins wurde anhand der grünen Fluoreszenz des GFP Proteins ermittelt. **(A)** Fluoreszenz-Aufnahme, dorsale Aufsicht eines injizierten Embryos (Stadium 40) mit einem kleineren linken Auge. **(B)** Fluoreszenz-Aufnahme, ventrale Aufsicht der Kopfregion des Embryos in A. **(C)** Phasenkontrast-Aufnahme von A. **(D)** Phasenkontrast-Aufnahme von B. **(E)** Longitudinal-Schnitt des Embryos in A, eingebettet in Paraffin und angefärbt mit Hematoxylin und Eosin. Die Pfeilköpfe markieren die Lage der verkleinerten Augen auf der injizierten Seite (inj.) im Vergleich zur nicht injizierten Seite (uninj.). Au: Auge, L: Linse, PE: Pigmentiertes Epithel, RE: Retina, Zd: Zementdrüse.

Einige der injizierten Embryonen (Abb. 21 A) wiesen stärkere Augenmißbildungen (Abb. 21 B und C) oder einen vollständigen Verlust des Auges auf (Daten nicht gezeigt). Die bereits äußerlich sichtbaren, mißgebildeten Augen (Abb. 21 C, Pfeilkopf) enthielten lediglich Reststrukturen, die morphologisch nicht genau zugeordnet werden können. So sind beispielsweise in Serienschnitten aus der Kopfregion des in Abbildung 21 C abgebildeten Embryos (Abb. 21 D und E) nur noch Reste eines pigmentierten Augenepithels erkennbar. Andere Bestandteile des Auges wie die Linse fehlen jedoch (Abb. 21 D und E).

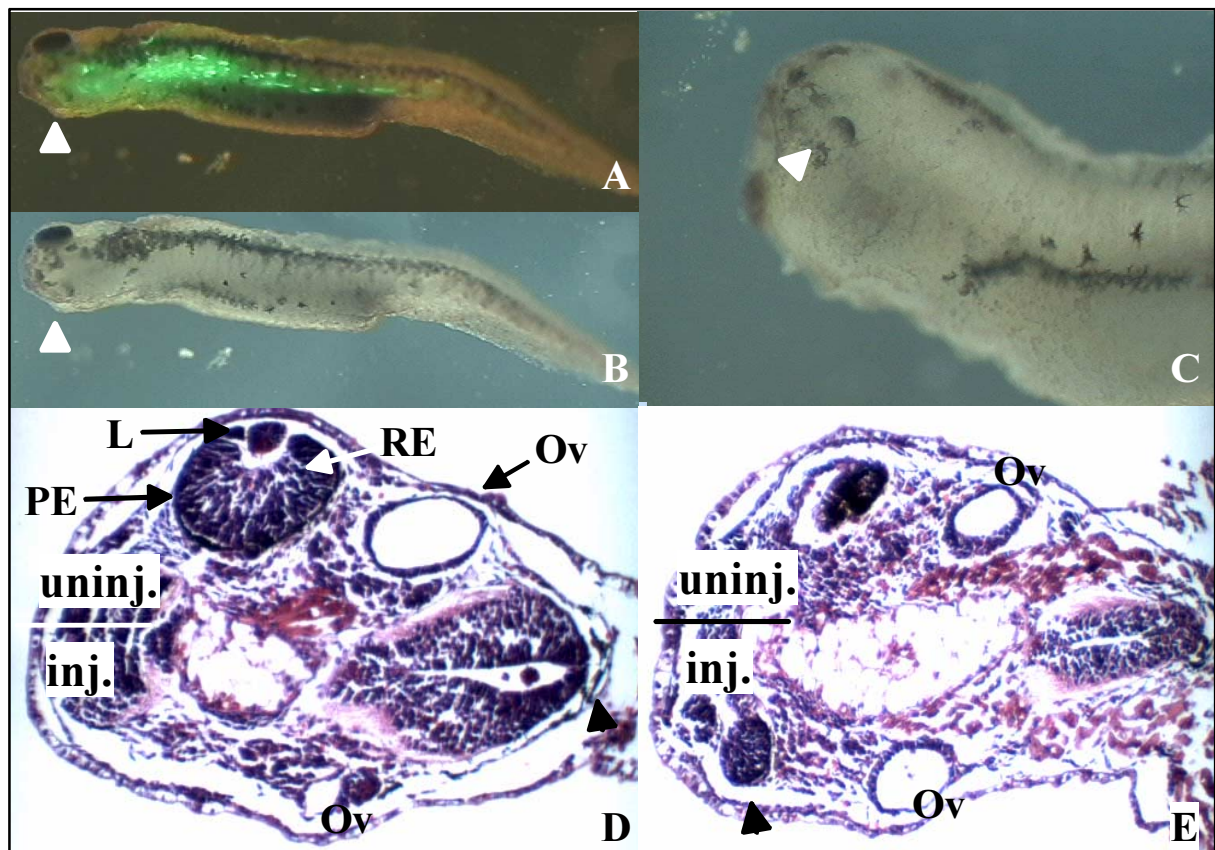


Abb. 21 XSiah-2 überexprimierende *Xenopus* Larve mit starker Augenmißbildung. (A) Fluoreszenz-Aufnahme, dorsale Aufsicht eines injizierten Embryos (Stadium 40) mit fehlentwickelten linken Auge. (B) Phasenkontrast-Aufnahme von F. (C) Laterale, vergrößerte Ansicht der Kopffregion des Embryos in B. (D), (E) Longitudinal-Schnitte durch die Kopffregion des Embryos in B, eingebettet in Paraffin und angefärbt mit Hematoxylin und Eosin. Die Pfeilköpfe markieren die Lage der Augen-Reststrukturen auf der injizierten Seite (inj.) im Vergleich zu der nicht injizierten Seite (uninj.). L: Linse, Ov: Ohr-Vesikel, PE: Pigmentiertes Epithel, RE: Retina.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Augendefekte tatsächlich aus der Überexpression eines funktionellen XSiah-2 Proteins resultieren, wurden Injektionsexperimente mit einer mutierten XSiah-2 mRNA durchgeführt. Diese enthält eine Rasterschubmutation zwischen dem Codon 12 und 13, die unmittelbar ein Stopcodon erzeugt, und daher kein funktionelles Protein kodiert.

Abbildung 22 zeigt, dass im Vergleich zum Wildtypen (oberer Embryo) die Mikroinjektion dieser mutierten XSiah-2 mRNA (unterer Embryo) nicht zu Augendefekten führt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die beobachteten Augendefekte nicht das Resultat eines unspezifischen RNA-Effekts sind, sondern auf der Überexpression eines funktionellen XSiah-2 Proteins beruhen.

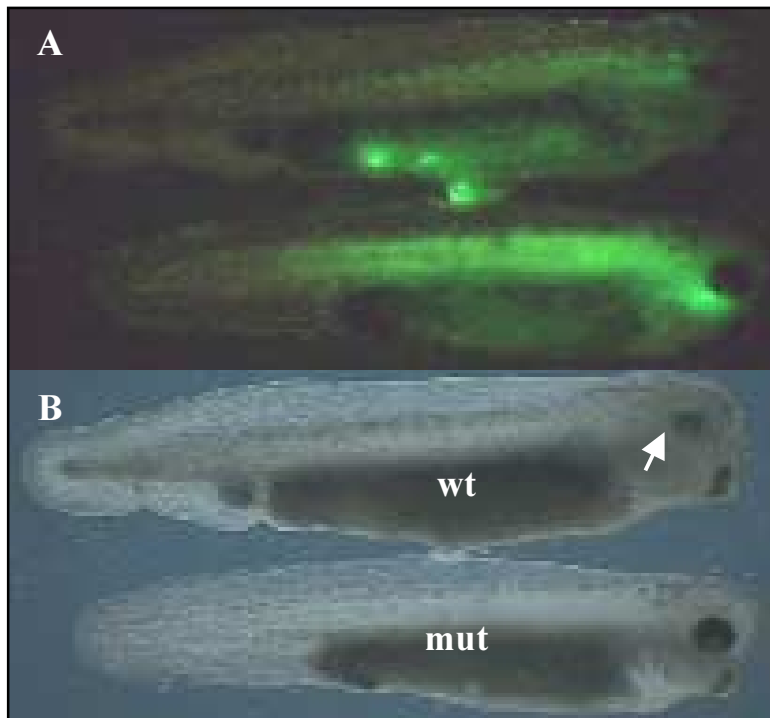


Abb. 22. Die Überexpression einer XSiah-2 Rasterschubmutante führt nicht zu Augendefekten.

Zwei-Zell Embryonen wurden in einer Blastomere *in vitro* synthetisierte Wildtyp XSiah-2 mRNA oder eine mutierte XSiah-2 mRNA mit GFP mRNA koinjiziert (A) Fluoreszenz-Aufnahme, laterale Ansicht von *Xenopus* Embryonen (Stadium 39); der obere Embryo wurde mit Wildtyp XSiah-2 mRNA (wt), der untere Embryo mit der mutierten XSiah-2 RNA (mut) injiziert. (B) Phasenkontrast-Aufnahme von A. Der Pfeil markiert das deutlich verkleinerte Auge bei Überexpression eines funktionellen XSiah-2 Proteins.

In einem weiteren Experiment wurde nun geklärt, welche Auswirkungen die Überexpression der carboxyterminalen Deletionsmutante XSiah-2 Δ C in *Xenopus* hat. Diese XSiah-2 Mutante entspricht einer natürlichen Sina Mutante, die in *Drosophila* zu einem Verlust der R7-Photorezeptorzellen führt. Zudem interagiert diese XSiah-2 Mutante nicht mehr mit DCoH/PCD. Wie in den vorherigen Experimenten wurde das XSiah-2 Δ C Protein durch Mikroinjektion der entsprechenden mRNA in eine Blastomere eines Zwei-Zell Embryos überexprimiert (Abb. 23).

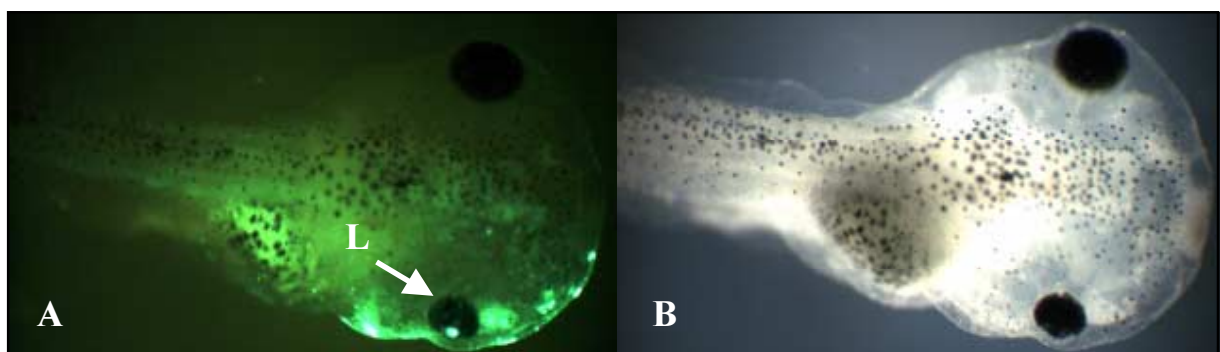


Abb. 23. Die Überexpression der Deletionsmutante XSiah-2 Δ C in *Xenopus* führt wie der XSiah-2 Wildtyp zu einer Reduktion der Augengröße. Koinjektion von *in vitro* synthetisierter XSiah-2 Δ C und GFP mRNA in eine Blastomere von Zwei-Zell Embryonen (A) Fluoreszenz-Aufnahme, dorsale Ansicht einer 4-Tage alten Larve (Stadium 45) (B) Phasenkontrast-Aufnahme von A. Der Pfeil markiert das deutlich verkleinerte Auge mit starker GFP-Fluoreszenz in der Linse (L).

Wie in Abbildung 23 dokumentiert, führt die Überexpression dieser Deletionsmutante ebenfalls wie das Wildtyp Protein zu einer Reduktion der Augengröße. Da dem XSiah-2 Δ C Protein der gesamte zur Interaktion mit DCoH/PCD notwendige C-Terminus fehlt, zeigt dieses Ergebnis dass die XSiah-2 induzierte Reduktion der Augengröße unabhängig von DCoH/PCD ist.

In der Tabelle 1 sind die verschiedenen Injektionsexperimente zusammengefasst.

Tab. 1 Zusammenfassung der Mikroinjektionen mit XSiah-2-wt, XSiah-2-mut und XSiah-2 Δ C mRNA

Injizierte RNA	Phänotyp (%)		Gesamtanzahl der Embryonen (einseitig fluoreszierend)
	Augendefekte	Normal	
XSiah-2-wt	30	53	550
XSiah-2-mut	2	88	115
XSiah-2ΔC	33	49	230

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, weisen bei einer Überexpression des XSiah-2 Wildtypen sowie der Deletionsmutante etwa 30 % der Embryonen die beschriebenen Augendefekte auf. Darüber hinaus traten bei Injektion von XSiah-2-wt und XSiah-2 Δ C mRNA andere Fehlentwicklungen auf. Diese umfassten zum größten Teil Bereiche des Rückenmarks (z.B. Spina bifida). Derartige Mißbildungen traten jedoch ebenfalls bei Embryonen auf, denen die Rasterschubmutante (XSiah-2-mut) injiziert wurde. Ein unspezifischer RNA-Effekt ist als mögliche Ursache dieser Defekte wahrscheinlich. Daher wurden die Embryonen mit derartigen Phänotyp nicht in der Tabelle 1 aufgelistet.

3.10 Die endogene XPax-6-Expression ist bei XSiah-2 Überexpression unverändert

Das Überexpressionsexperiment weist auf eine Beteiligung von XSiah-2 im Entwicklungsprozess des Vertebraten-Auges hin. Der Paired-Class-Homeobox-Transkriptionsfaktor PAX-6 übernimmt die Funktion eines *master gene* in der Entwicklung der Augen. Bisherige Untersuchungen belegen, dass PAX-6 sowohl notwendig als auch ausreichend für die Augenentwicklung ist (Gruss et al., 1998; Chow et al., 1999). Das *Xenopus* Pax-6 wird in der Embryogenese im prospektiven Gewebe des Auges exprimiert (Hirsch and Harris, 1997). Der *in situ* Nachweis des XPax-6 Transkriptes in *Xenopus*-Embryonen (Stadium 36) zeigt, dass das Expressionsmuster mit dem von XSiah-2 korreliert (Abb. 24 A und B).

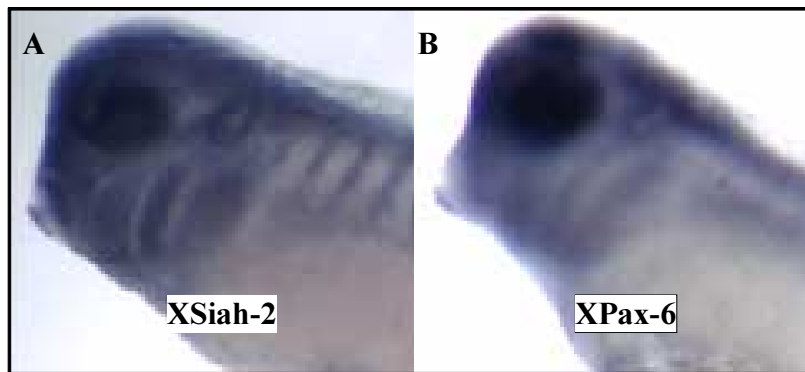


Abb. 24 Vergleich der Expressionsmuster zwischen XSiah-2 und XPax-6 in *Xenopus*. Whole Mount in situ Hybridisierungen mit *Xenopus* Larven (Stadium 36) mittels Digoxigenin markierter Antisense RNA-Sonden gegen (A) XSiah-2, (B) XPax-6 nach Harland (1991).

Im Gegensatz zu dem *Xenopus* DCoH/PCD, dessen Expression im Augenbereich auf das pigmentierte Epithel (PE) beschränkt ist (Pogge von Strandmann and Ryffel, 1995), werden XPax-6 und XSiah-2 (Abb. 24, vgl. A und B) im gesamten Auge exprimiert.

In einem weiteren Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob bei XSiah-2 überexprimierenden Embryonen die Expression des endogenen XPax-6 verändert ist. Hierzu wurden *in situ* Whole Mount Hybridisierungen von XPax-6 mit Neurulae (Stadium 21) und *Xenopus* Larven (Stadium 32) durchgeführt, die zuvor im Zwei-Zell Stadium in eine Blastomere mit XSiah-2 und GFP2 mRNA injiziert wurden (Abb. 25). Als Vergleichskontrolle diente das Expressionsmuster von XPax-6 auf der nicht injizierten Seite sowie von nicht injizierten Embryonen.

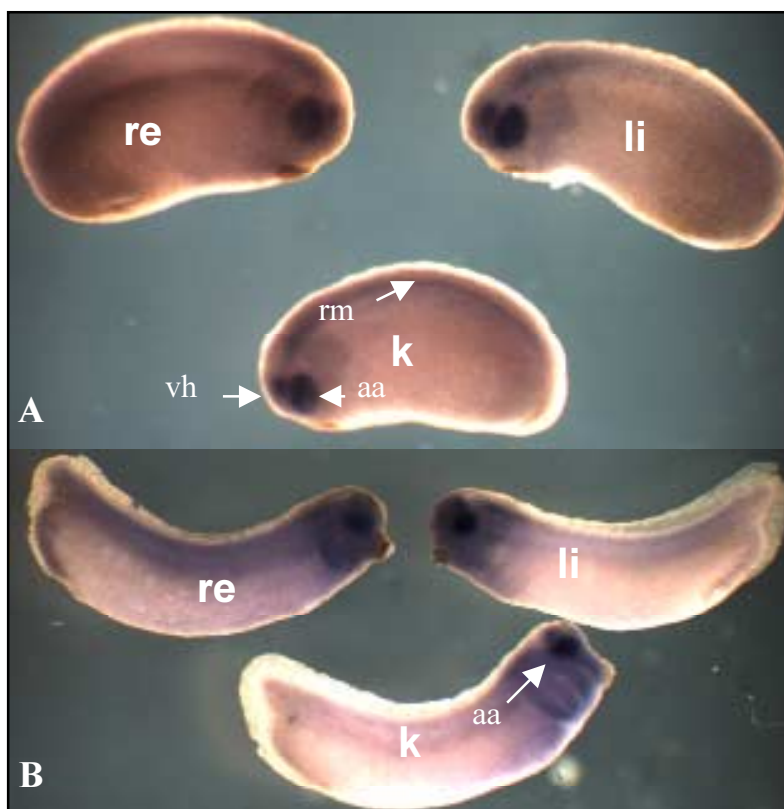


Abb. 25 Die Expression des endogenen XPax-6 ist in XSiah-2 überexprimierenden Embryonen unverändert. Zwei-Zell Embryonen wurden in einer Blastomere *in vitro* synthetisierte XSiah-2 mRNA und GFP mRNA koinjiziert (A) Neurulae (Stadium 25) und (B) Larven (Stadium 32) mit einseitiger GFP-Fluoreszenz wurden aussortiert und mit einer Digoxigenin markierten XPax-6 Antisense RNA inkubiert. Die hybridisierte RNA wurde immunologisch mit Hilfe eines enzymgekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpers detektiert. re: rechts injiziert, li: links injiziert, k: nicht injiziert. aa: Augenanlage, rm: Rückenmark, vh: Vorderhirn.

Wie aus der Abbildung 25 ersichtlich, markieren die Färbungen, die die Lokalisation des XPax-6-Transkriptes anzeigen, am stärksten das Augengebiet (aa) der untersuchten Embryonen (Stadium 25 und 32), bevor die Augen eigentlich sichtbar sind. Zusätzlich wird XPax-6 im prospektiven Vorderhirn (vh) und im Rückenmark (rm) exprimiert. Zwischen den einseitig rechts (re) oder links (li) XSiah-2 injizierten Embryonen und den Kontroll-Embryonen (k) sind weder quantitativ noch qualitativ Unterschiede im Expressionsmuster von XPax-6 zu erkennen. Insgesamt wurden bei allen untersuchten *Xenopus* Embryonen (n=21) eine unveränderte XPax-6-Expression gefunden. Um zu überprüfen, ob in diesem Experiment die Überexpression von XSiah-2 zu einer Verkleinerung des Auges auf der injizierten Seite führt, wurde ein Teil der injizierten Embryonen weiter bis zum Stadium 40 kultiviert, so dass die Augen äußerlich zu erkennen sind. Diese *Xenopus* Embryonen im Stadium 40 zeigten zu 27 % eine Reduktion der Augen auf der injizierten Körperseite. Dies belegt eine unveränderte endogene Pax-6-Expression auf der XSiah-2 überexprimierenden Körperseite trotz verkleinerter Augen. Demnach beeinflusst die Überexpression von XSiah-2 nicht die Expression des endogenen XPax-6, so dass die XSiah-2 induzierten Augendefekte nicht das Resultat einer veränderten XPax-6-Expression sind.

3.11 Die Überexpression beeinflusst den XSiah-2 induzierten Phänotyp nicht und *vice versa*

In den vorherigen Injektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von XSiah-2 zu einer Fehlentwicklung der Augen führt. In vergleichbaren Experimenten (Pogge von Strandmann et al., 2000) führt eine Überexpression von DCoH/PCD zur Induktion ectopischer Pigmentzellen in der Epidermis von *Xenopus* (Abb. 26).

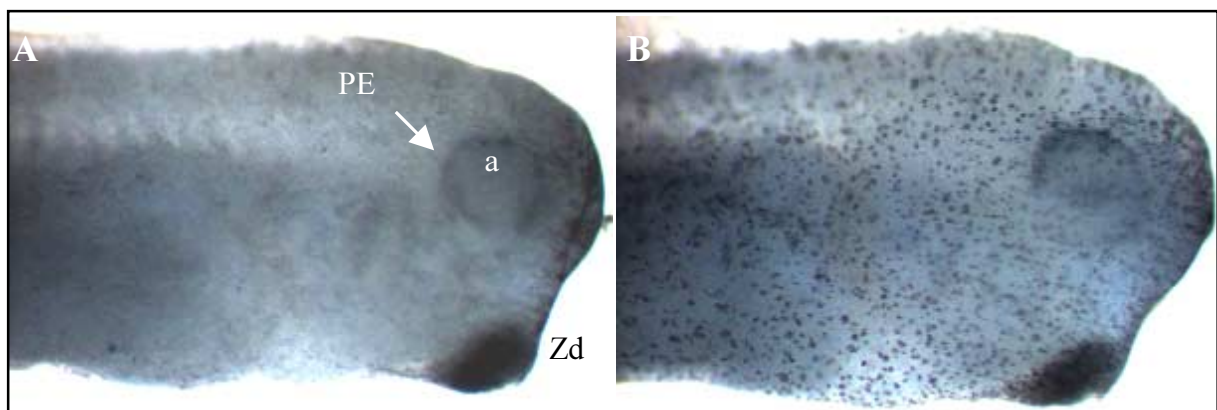


Abb. 26. Die Überexpression von DCoH/PCD induziert die Bildung ectopischer Pigmentzellen in *Xenopus*. Laterale Ansicht der Kopfregion von *Xenopus* Larven (Stadium 29), denen im Zwei-Zell Stadium *in vitro* synthetisierte (A) GFP mRNA oder (B) *Xenopus* DCoH/PCD mRNA und GFP mRNA injiziert wurde. Der rechte Embryo zeigt deutlich die ubiquitäre Verteilung ectopischer Pigmentzellen in der Epidermis. a: Auge, PE: pigmentiertes Epithel des Auges, Zd: Zement-Drüse.

Neben der Induktion ektopischer Pigmentzellen zeigten die DCoH/PCD überexprimierenden *Xenopus* Embryonen eine verzögerte endogene Pigmentierung (Pogge von Strandmann et al., 2000). Diese verzögerte endogene Pigmentierung tritt insbesondere im pigmentierten Epithel des Auges auf, einem Zelltyp, in denen die beiden Interaktionspartner DCoH/PCD und XSiah-2 koexprimiert werden. Um festzustellen, inwieweit nun eine Koexpression beider Faktoren die beobachteten Phänotypen (Ektopische Pigmentierung und Augen-Fehlentwicklung) des jeweiligen Interaktionspartners beeinflusst, wurden Koinjektionen mit *in vitro* synthetisierten XSiah-2 und DCoH/PCD mRNA durchgeführt (Abb. 27).

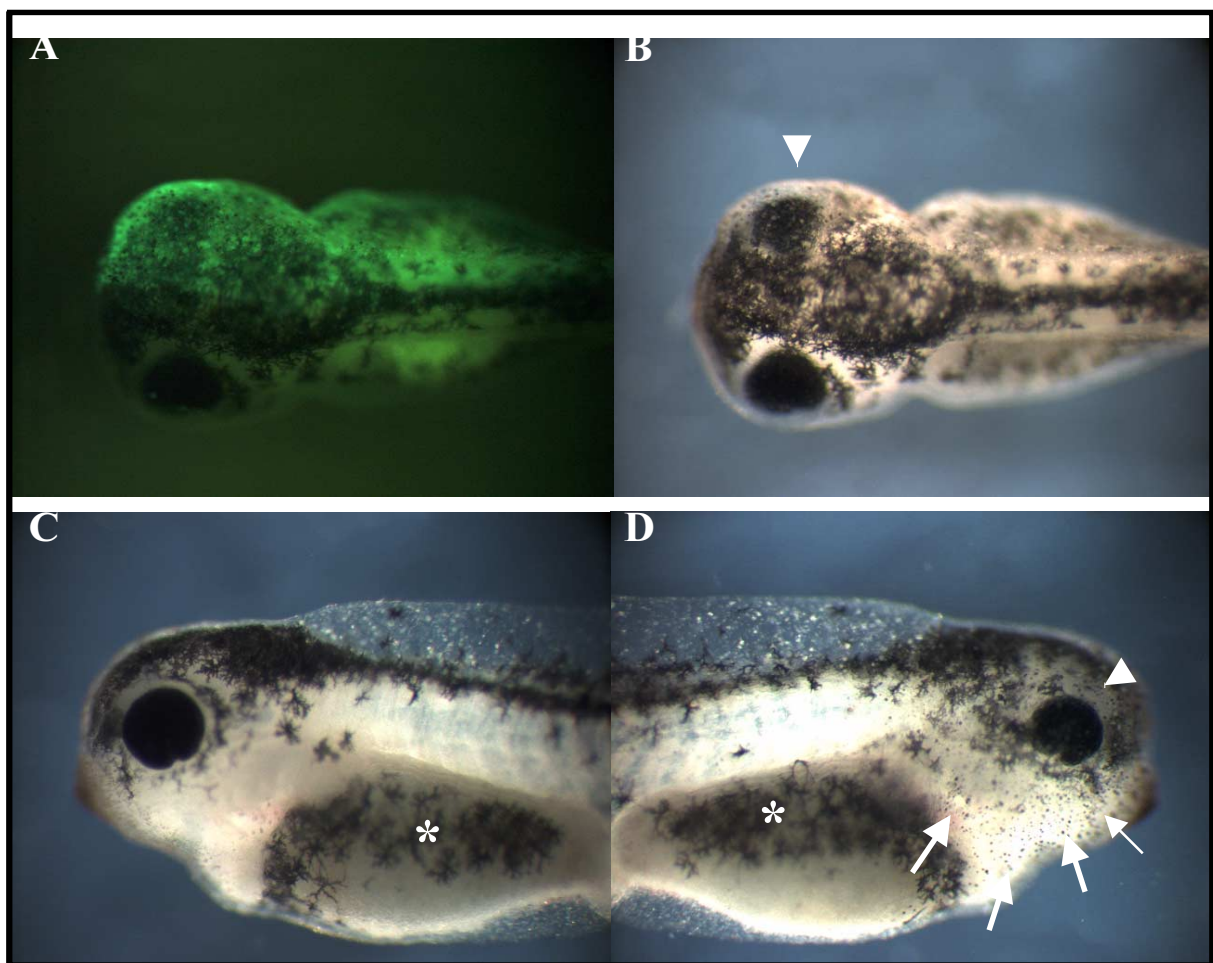


Abb. 27 DCoH/PCD / XSiah-2 koexprimierende *Xenopus* Embryonen weisen sowohl eine ektopische Pigmentierung als auch Augendefekte auf. Zwei-Zell Embryonen wurde in einer Blastomere *in vitro* synthetisierte XSiah-2 mRNA, *Xenopus* DCoH/PCD mRNA und GFP mRNA koinjiziert **(A)** Fluoreszenz-Aufnahme; dorsale Aufsicht eines Embryos (Stadium 39), der in der rechten Körperhälfte die rekombinaten Proteine XSiah-2, DCoH/PCD und GFP überexprimiert. **(B)** Phasenkontrast-Aufnahme von A. **(C)** Laterale Ansicht der linken Körperhälfte. **(D)** Laterale Ansicht der rechten Körperhälfte mit ektopischer Pigmentierung (Pfeile) und Augenreduktion (Pfeilkopf). Die sternförmigen, endogenen Pigmentzellen sind mit einem Stern (*) markiert.

Die Abbildung 27 zeigt einen Embryo, dem XSiah-2 und DCoH/PCD mRNA im Zwei-Zell Stadium injiziert wurde. Dieser Embryo überexprimiert XSiah-2 und DCoH/PCD in der rechten Körperhälfte, wie man anhand der grünen Fluoreszenz des GFP Proteins erkennt (Abb. 27 A). Abbildung 27 B (Pfeilkopf) zeigt, dass dieser Embryo auf der rechten Seite im Vergleich zur nicht injizierten, linken Körperseite (Abb. 27 C) ein kleineres Auge aufweist, induziert durch die Überexpression von XSiah-2. Zusätzlich zum verkleinerten Auge hat dieser Embryo ektopische Pigmentzellen (Abb. 27 D, Pfeile), die durch die Überexpression von DCoH/PCD induziert werden. Diese ektopischen Pigmentzellen unterscheiden sich in der Form deutlich von den sternförmigen, endogenen Pigmentzellen (Abb. 27 C und D, Sterne).

Die in der Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse dieser Koinjektionen belegen insgesamt eine unveränderte Häufigkeit der beiden Phänotypen bei Koexpression im Vergleich zu der alleinigen Expression von XSiah-2 oder DCoH/PCD. Die Bildung ektopischer Pigmentzellen wird in 95 % aller untersuchten Embryonen durch DCoH/PCD induziert, unabhängig davon, ob XSiah-2 koexprimiert wird. Die Häufigkeit der XSiah-2 induzierten Augendefekte bei Koexpression liegt bei 32 % und ist somit nahezu unverändert. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, zeigte eine geringe Anzahl von DCoH/PCD überexprimierenden Embryonen ebenfalls zu 6 % Augendefekte, die bei alleiniger Expression von GFP2 zu 2 % auftreten.

Tab. 2 Zusammenfassung der Koinjektionen mit XSiah-2-wt und *Xenopus* DCoH/PCD mRNA

Phänotyp einseitig fluoreszierender Embryonen	Injizierte mRNA			
	XSiah-2	DCoH/PCD	DCoH/PCD + XSiah-2	GFP2
Ektopische Pigmentierung [%]	0	95,1	95,4	0
Augendefekte [%]	29	6	32,2	2
Gesamtanzahl	180	176	180	83

In dieser Analyse konnte somit keine Beeinflussung des jeweiligen Phänotypen ermittelt werden, die eine funktionelle Interaktion zwischen XSiah-2 und dem *Xenopus* DCoH/PCD belegt. Demnach können beide Faktoren unabhängig voneinander in der Embryogenese von *Xenopus* wirken.

4. Diskussion

4.1 *Seven in absentia* und DCoH/PCD – zwei maternale Interaktionspartner mit vielfältigen Funktionen

Die Embryonalentwicklung verschiedener Species verläuft sehr unterschiedlich, dennoch hat sich aber gezeigt, dass viele gemeinsame genetische Systeme existieren. Voraussetzung für diese gemeinsamen Systeme ist eine starke Konservierung der beteiligten Faktoren während der Evolution. Das DCoH/PCD ist ein Beispiel für ein stark konservierten Faktor, der bei Vertebraten maternal im Ei gespeichert ist (Pogge von Strandmann and Ryffel, 1995; Pogge von Strandmann et al., 1998). DCoH/PCD übernimmt in der Entwicklung von Vertebraten, aber vermutlich auch bei Invertebraten wie in der Fruchtfliege *Drosophila* (Seong et al., 1998) eine Vielzahl konservierter Funktionen. Als konservierter Bestandteil eines regulatorischen Netzwerks übt DCoH/PCD vermutlich in Kooperation mit anderen, ebenfalls konservierten Faktoren diese unterschiedlichen Funktionen aus. Einige dieser Interaktionspartner des *Xenopus* DCoH/PCD konnten mit Hilfe einer *Two Hybrid* Analyse aus einer *Xenopus* Oocyten cDNA-Bank identifiziert werden (Pogge von Strandmann et al., unveröffentlicht). Einer dieser neuen, maternalen Interaktionspartner, das *Xenopus Seven in absentia* Homolog 2 (XSiah-2), wurde in der vorliegenden Arbeit isoliert und charakterisiert. Das *Seven in absentia* Gen wurde ursprünglich in *Drosophila* (Sina) entdeckt, wo es essentiell für die Differenzierung der R7-Photorezeptorzellen im Insektenauge ist. Das *Xenopus* Homolog von *Seven in absentia* (XSiah-2) ist zu 67 % mit dem *Drosophila* Protein (Sina) identisch (Abb. 8) und somit wie sein Interaktionspartner DCoH/PCD stark konserviert.

Das humane Genom enthält zwei homologe *Seven in absentia* Varianten (Siah-1 und Siah-2), und das murine Genom verfügt darüber hinaus über drei Varianten (Siah-1A, Siah-1B und Siah-2). Diese Varianten sind wahrscheinlich durch Duplikationen des *Drosophila* Gens entstanden, und spiegeln möglicherweise die im Verlauf der Evolution zunehmende Funktionsvielfalt des *Seven in absentia* Gens wider. Der Vergleich der Primärstruktur zwischen dem *Xenopus* Protein und den bekannten Säuger Homologen (Maus und Mensch) erlaubt eine Zuordnung zu Siah-2 (Abb. 8). So weist XSiah-2 zu dem murinen und humanen Siah-2 Protein 85 % Aminosäuren-Identität auf. Im Vergleich dazu ist XSiah-2 aufgrund der geringen Konservierung im N-Terminus (Aminosäure 1 bis 58) lediglich zu 68 % mit den Siah-1 Proteinen identisch (Abb. 8). Angesichts der hohen Ähnlichkeit des *Xenopus* Proteins

zu den Säuger Siah-2 Homologen ist anzunehmen, dass das *Xenopus* Genom ebenfalls noch über eine Siah-1 Variante verfügt.

Mit Ausnahme des N-Terminus (Aminosäure 1 bis 67) sind die *Seven in absentia* Proteine insgesamt durchgehend stark konserviert. Dieser hochkonservierte Bereich umfasst bei XSiah-2 über zwei Drittel des gesamten Proteins (Aminosäure 68 bis 313) und ist mit 95 % nahezu vollständig identisch mit dem humanen Siah-2 Protein (Abb. 9).

Im Aminoterminus dieser hochkonservierten Region liegt das RING-Zinkfinger Motiv (Aminosäure 68 bis 104), das zwischen XSiah-2 und HumSiah-2 absolut identisch ist. Das RING-Zinkfinger Motiv besteht aus einer linearen Abfolge konservierter Cystein- und Histidinreste. Wie strukturelle Analysen einiger Mitglieder dieser Proteinfamilie (Saurin et al., 1996) belegen, bildet das RING-Zinkfinger Motiv eine β -Faltblatt aus, die zwei Zinkatome bindet. Die Familie der RING-Finger Proteine umfasst derzeit über 200 Mitglieder mit ganz unterschiedlichen Funktionen (zur Übersicht: Saurin et al., 1996; Freemont, 2000). Das erste Mitglied dieser heterogenen Proteinfamilie, das RING-1 wirkt als transkriptioneller Repressor (Satijn et al., 1997). Einige Mitglieder sind an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden beteiligt wie beispielsweise der p53-Inhibitor Mdm-2 (Xiao et al., 1995) oder das *Breast Cancer Susceptibility Gene* BRCA-1 (Miki et al., 1994). Andere wiederum übernehmen Funktionen in der Biogenese der Peroxisomen (Waterham and Cregg, 1997). Bei einigen Mitgliedern dieser Proteinfamilie vermittelt die RING-Finger Domäne Protein-Protein-Interaktionen wie beispielsweise zwischen dem BRCA-1 und dem BARD-1 (Wu et al., 1996). Bei anderen Mitgliedern übernimmt die RING-Finger Domäne eine wesentliche Bedeutung in der Ubiquitin vermittelten Proteolyse von Zielproteinen (Martinez-Noel et al., 1999; Lorick et al., 1999). Eine solche Ubiquitin abhängige Degradation des transkriptionellen Repressors *Tramtrack* (Ttk88) wurde erstmals für das *Drosophila Seven in absentia* (Sina) gezeigt (Li et al., 1997). Angesichts der bekannten molekularen Funktion von Sina in der Ubiquitin abhängigen Proteolyse, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das *Xenopus Seven in absentia* Homolog (XSiah-2) ebenfalls seinen neuen Interaktionspartner DCoH/PCD proteolytisch abbaut. Hierzu wurden Western Blot Analysen aus Lysaten von Myc-DCoH/PCD und XSiah-2 kotransfizierten Zellen durchgeführt (Abb. 19). Es zeigte sich hierbei, dass das *Xenopus* DCoHPCD Protein nicht durch XSiah-2 proteolytisch abgebaut wird. Zur qualitativ besseren Detektion des Proteins wurden diese Transfektionsexperimente mit einem Myc-DCoH/PCD Fusionsprotein durchgeführt. Daher ist es theoretisch möglich, dass der relativ große heterologe Proteinanteil eine solche XSiah-2 vermittelte Proteolyse

verhindert. Zur Klärung dieser Möglichkeit ist eine vergleichbare Analyse mit einem unveränderten DCoH/PCD Protein notwendig, die jedoch die Verwendung eines geeigneten Antiserums erfordert.

Eine funktionelle Konservierung der Proteolyse induzierenden Eigenschaft ist für die Säuger Homologen von *Seven in absentia*, MSiah-2 und HumSiah-2 in vergleichbaren Kotransfektionsexperimenten gezeigt worden. Die beiden Zielproteine sind zum einen das DCC (*Deleted in Colon Cancer*), der Rezeptor für Netrin-1, ein axonaler und zellulärer Steuerungsfaktor; und zum anderen der nukleäre Rezeptor-Corepressor N-CoR (Hu et al., 1997; Zhang et al., 1998). Für das DCC konnte überdies nachgewiesen werden, dass die RING-Finger-Domäne für die Proteolyse vermittelnde Eigenschaft der Siah Proteine notwendig ist (Hu and Fearon, 1999).

Eine regulatorische Funktion von XSiah-2 muß jedoch nicht ausschließlich posttranslational erfolgen. Dies wird durch die Existenz einiger Interaktionspartner des murinen und des humanen Siah-2 Proteins belegt, die keine Zielproteine einer Siah vermittelten Proteolyse sind (Ishikawa et al., 1999; Germani et al., 1999; Relaix et al., 2000). Ein Beispiel dafür bietet das *Vav* Protein, ein Rac1-GDP/GTP-Austauscher, der im Verlauf der Hämopoese verschiedene Stress aktivierte Kinasen aktiviert (Romero and Fischer, 1996). Das humane Siah-2 Protein, das mit *Vav* in einer *Two Hybrid* Analyse als Interaktionspartner isoliert wurde, inhibiert diese *Vav* vermittelten Signaltransduktionswege, ohne es jedoch proteolytisch zu degradieren (Germani et al., 1999). Der molekulare Mechanismus dieser Inhibition durch HumSiah-2 ist ungeklärt.

Bei allen näher charakterisierten Interaktionen der Siah Proteine ist der C-Terminus notwendig. Dies gilt auch für die Interaktion zwischen dem XSiah-2 und dem *Xenopus* DCoH/PCD Protein, wie die in dieser Arbeit durchgeführte *Two Hybrid* Analyse belegt (Abb. 12 B). Die Aminosäuren 260 bis 313 im C-Terminus von XSiah-2 sind notwendig und zugleich ausreichend für eine Interaktion mit dem DCoH/PCD Protein. Eine Deletion des C-Terminus des XSiah-2 Proteins (Aminosäure 206 bis 313) führt zu einem Verlust der DCoH/PCD-Bindung (Abb. 12 C). Dieses C-terminal verkürzte XSiah-2 Protein entspricht der natürlichen *Drosophila* Mutante, die zu einem Verlust der R7-Photorezeptorzellen führt. Ein Verlust der Interaktion ist ebenfalls bei einer Deletion der RING-Finger Domäne (Aminosäuren 68 bis 104) zu beobachten (Abb. 12 D). Obwohl das entsprechende XSiah-2 Δ R Protein mit dieser Deletion den gesamten zur Interaktion ausreichenden C-Terminus besitzt, interagiert es nicht mehr mit DCoH/PCD. Dieses Ergebnis resultiert möglicherweise aus einer

strukturellen Veränderung des Proteins, die einen Zugang des interagierenden C-Terminus verhindert. Die Faltung des RING-Finger Motivs in eine zentrale β -Faltblatt, schließt eine solche Strukturveränderung des XSiah-2 Δ R Proteins nicht aus.

Die Tatsache, dass die Siah-2 Proteine sehr viele Interaktionspartner haben, weist auf ihre vielfältigen zellulären Funktionen hin. Eine ähnlich hohe funktionelle Vielfalt weist das DCoH/PCD Protein auf. Neben der genregulatorischen Funktion als positiver **Dimerisierungs-Cofaktor** der **HNF1**-Proteine (DCoH) weist es eine enzymatische Funktion als **Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase** (PCD) auf (zur Übersicht: St-Arnaud). Unabhängig von diesen beiden Aktivitäten übernimmt DCoH/PCD eine Funktion in der Differenzierung von Pigment produzierenden Zellen, wie die Induktion ektopischer Pigmentzellen bei Überexpression in *Xenopus* zeigt (Pogge von Strandmann et al., 2000). Um festzustellen, ob möglicherweise XSiah-2 und DCoH/PCD in diesem zellulären Kontext kooperativ agieren, wurden beide Faktoren in *Xenopus* Embryonen überexprimiert (Abb. 27). Eine solche funktionelle Interaktion beider Faktoren in der Differenzierung von Pigment produzierenden Zellen besteht jedoch nicht: Die Überexpression von XSiah-2 beeinflusst nämlich weder qualitativ noch quantitativ die durch DCoH/PCD induzierte Bildung ektopischer Pigmentzellen in *Xenopus* (Abb. 27 D). Demzufolge fungiert DCoH/PCD in der Differenzierung von Pigmentzellen unabhängig von XSiah-2 und kooperiert mit XSiah-2 in einem anderen zellulären Kontext.

Dieser gemeinsame Kontext besteht möglicherweise wesentlich früher in der Embryogenese von *Xenopus* und ist unabhängig von den HNF1-Transkriptionsfaktoren, wie das Expressionsprofil beider Interaktionspartner vermuten läßt: Im Gegensatz zu HNF1 α/β liegt DCoH/PCD maternal vor (Pogge von Strandmann et al., 1995). XSiah-2 wird ebenfalls maternal expriert (Abb. 13). Die XSiah-2 Transkripte sind im Froschei verstärkt in der animalen Hemisphäre detektierbar (Abb. 14). Diese maternale Lokalisation ist konserviert; das *Drosophila* Seven in absentia (Carthew and Rubin, 1990) sowie das murine Siah-2 (Della et al., 1993; Della et al., 1995) liegen ebenfalls prälokalisiert im Ei vor, was für eine konservierte Bedeutung dieses Faktors in der frühen Phase der embryonalen Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten spricht. Da in diesen Expressionsanalysen lediglich die Transkripte von *Seven in absentia* nachgewiesen wurden, ist unklar, ob ausschließlich die mRNA oder auch das Protein im Ei maternal gespeichert vorliegt. Unter der Voraussetzung, dass ausschließlich die mRNA maternal gespeichert ist, könnte eine Depletion der Transkripte durch Injektion von Antisense Oligonukleotide (Haesman et al., 1994), Aufschluß zur

maternalen Funktion von XSiah-2 geben. Falls XSiah-2 wie das *Xenopus* DCoH/PCD als Protein maternal vorliegt, wäre diese Methode nicht geeignet, um die Aktivität dieses Faktors in *Xenopus* auszuschalten. Die Injektion spezifischer Antikörper gegen das XSiah-2 in *Xenopus* Eier bietet in diesem Fall eine Alternative.

Gegenwärtig existieren zwei interessante Aspekte, die einen funktionellen Zusammenhang zwischen *Seven in absentia* und DCoH/PCD herstellen. Beide gelten als Kandidatengene für das sogenannte *Usher-Syndrom*, einem Krankheitsbild, das bei verschiedenen autosomal-rezessiven Erbkrankheiten beim Menschen auftritt. HumSiah-2 ist auf dem Chromosomenabschnitt 3q22-25 (Hu et al., 1997) lokalisiert, der mit dem Usher-Syndrom-Typ 2 und 3 assoziiert ist (Hmani et al., 1999; Sankila et al., 1995), wohingegen DCoH/PCD in der Chromosomregion 10q22 (Thony and Mattei, 1994) liegt, die dem Usher-Syndrom-Typ 1 zugeordnet wird (Wayne et al., 1996). Trotz der genetischen und klinischen Heterogenität der über 200 Patienten mit Usher-Syndrom, ist ihnen eines gemeinsam: ein kombinierter Verlust des Seh- und Hörvermögens (zur Übersicht: Keats and Corey, 1999).

Der zweite Hinweis einer möglichen funktionellen Verbindung zwischen *Seven in absentia* und DCoH/PCD ergibt sich aus neueren Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass das humane DCoH/PCD sowohl in colorectalen Tumoren als auch colorectalen Tumorzelllinien überexprimiert wird (Eskinazi et al., 1999). Das humane Siah-1 Protein wird während des physiologischen Zelltods (Apoptose) von Dünndarmzellen aktiviert (Nemani et al., 1996). Außerdem wird HumSiah-1 in Tumorzellen, die bezüglich der Suppression des tumorigenen Phänotyps selektiert wurden, konstitutiv exprimiert (Amson et al., 1996). Aufgrund der Apoptose-induzierenden und tumorsupprimierenden Aktivität von HumSiah-1 ist anzunehmen, dass HumSiah-1 eine Schutzfunktion vor Zelltransformationen übernimmt (Roperch et al., 1999). Unter der Voraussetzung, dass HumSiah-1 die Expression von DCoH/PCD in Dünndarmzellen negativ reguliert, könnte ein Funktionsausfall von HumSiah-1 zu einer Überexpression von DCoH/PCD führen, wie sie in Dünndarmtumoren beobachtet wurde.

4.2 XSiah-2 hat eine Bedeutung in der Augenentwicklung von Vertebraten

Besonders für die Augenentwicklung von Invertebraten und Vertebraten existieren eine Vielzahl gemeinsamer genetischer Systeme. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass homologe Proteine in verschiedenen Tieren auch unterschiedliche Funktionen übernehmen können. So regulieren homologe Gene wie beispielsweise *dach2*, *eya2* und *six1*, die in *Drosophila* für die Augenbildung notwendig sind, bei Vertebraten auch synergistisch die Bildung der Muskeln (Heanue et al., 1999).

Seven in absentia scheint jedoch in Invertebraten und Vertebraten gleichermaßen in der Augenentwicklung eine Bedeutung zu haben. Einen ersten Hinweis auf diese konservierte Funktion von XSiah-2 bei Vertebraten gibt das räumliche Expressionsprofil während der Embryogenese von *Xenopus*. Das maternal prälokalisierte XSiah-2 Transkript konzentriert sich im Verlauf der Entwicklung in den kranialen Neuralstrukturen, insbesondere im Auge, im Vorderhirn, aber auch entlang des Rückenmarks und der Spinalnerven in der Embryogenese von *Xenopus* (Abb. 14 B-D). Dieses Expressionsmuster von XSiah-2 entspricht dem des *Drosophila* Sina (Carthew and Rubin, 1990) und dem des murinen MSiah-2 (Della et al., 1993): Beide Homologe werden sehr stark in der Kopffregion, insbesondere im Auge exprimiert. Demnach ist die Expression des *Seven in absentia* Gens im embryonalen Auge zwischen Invertebraten und Vertebraten konserviert.

Einen zweiten Hinweis auf eine funktionelle Konservierung von *Seven in absentia* bei Vertebraten gibt die Überexpression von XSiah-2 durch Mikroinjektion *in vitro* synthetisierter mRNA in eine Blastomere von Zwei-Zell-Embryonen: 30 % der XSiah-2 überexprimierenden *Xenopus* Larven (aller einseitig grün fluoreszierenden Larven) zeigen signifikante Augendefekte auf der injizierten Seite (Abb. 20 und 21). Die Mehrzahl der Larven mit Augendefekten weist eine deutliche Reduktion der Augengröße auf, das Resultat einer generellen Verkleinerung aller Augenbestandteile, wie die histologische Analyse zeigt (Abb 20 E). Einige injizierte Larven (<10 %) weisen stärkere morphologische Defekte im Augenbereich auf. Bei ihnen sind Augenbestandteile wie das pigmentierte Epithel und die Retina in Form und Lage morphologisch kaum noch erkennbar; Strukturen wie die Linsen fehlen oft vollständig (Abb. 21 D und E). Die Augendefekte resultieren aus der Überexpression eines funktionellen Proteins und sind nicht das Ergebnis eines unspezifischen RNA-Effekts. Dies belegen Mikroinjektionen der mRNA einer Rasterschubmutante, die kein

funktionelles Protein kodiert und somit erwartungsgemäß keine Augendefekte induziert (Abb. 22).

Ähnliche Augendefekte, wie sie bei einer transienten Überexpression von XSiah-2 in *Xenopus* auftreten, sind auch bei transgenen Fliegen, die Sina unter der Kontrolle eines rekombinanten *Glass*-Promotors überexprimieren, beobachtet worden (Neufeld et al., 1998). Diese transgenen Fliegen weisen Komplexaugen auf, die in ihrer Größe und Pigmentierung stark reduziert sind. Charakteristische Bestandteile des Komplexauges fehlen nicht, obwohl bei einigen Fliegen, die Sina schwächer exprimieren, eine Desorganisation der Augenstrukturen zu beobachten ist (Neufeld et al., 1998). Im Gegensatz zu den transient überexprimierenden *Xenopus*-Embryonen weist die Mehrheit der transgenen Fliegen diese Augendefekte auf. Anders als bei den injizierten *Xenopus* Embryonen, erfolgt jedoch in den transgenen Fliegen die Überexpression des Sina Proteins unter der Kontrolle des gewebespezifischen *Glass*-Promotors. Der verwendete Promotor besteht aus multimeren Segmenten aus der 5'-Kontrollregion des *Glass*-Gens. Diese regulatorischen DNA-Elemente bewirken, dass der *Drosophila* Transkriptionsfaktor *Glass* zellspezifisch, ausschließlich in den Photorezeptorzellen (R1-R8) des Insektenauges exprimiert wird (Liu et al., 1996). Unter Verwendung dieser Promotorsequenzen wird Sina daher in den entsprechenden transgenen Fliegen spezifisch in den Photorezeptorzellen überexprimiert. Dagegen führt die RNA-Mikroinjektion in Zwei-Zell *Xenopus* Embryonen zu einer ubiquitären Überexpression von XSiah-2. Dieser wesentliche Unterschied zwischen den transgenen Fliegen und den *Xenopus* Embryonen ist möglicherweise der Grund, wieso nur 30 % der injizierten *Xenopus*-Embryonen (mit GFP-Fluoreszenz) derartige Augendefekte haben. Anders als bei einer ubiquitären Überexpression von XSiah-2 in *Xenopus*, wirkt das überexprimierte Sina Protein ausschließlich in den Photorezeptorzellen, einem Zelltyp, in dem es endogen exprimiert wird und eine physiologische Bedeutung hat. Diese gezielte Überexpression von *Seven in absentia* in transgenen Fliegen, die im Vergleich zu den injizierten *Xenopus* Embryonen zudem stabil ist, hat vermutlich quantitativ, stärkere negative Auswirkungen auf den Differenzierungsprozeß des Auges, so dass die Mehrheit Augendefekte aufweist.

Ungeachtet der quantitativen Unterschiede führt insgesamt also die Überexpression von Sina in *Drosophila* und von XSiah-2 in *Xenopus* zu einem äquivalenten Phänotyp. Demnach wirken beide homologen Proteine bei einer Überexpression wahrscheinlich in gleicher Weise auf die zellulären Prozesse während der Augenentwicklung. Im Vergleich zum Vertebraten-

Homolog XSiah-2 ist die zelluläre Funktion des *Drosophila Seven in absentia* (Sina) für die Entwicklung des Komplexauges bereits gut charakterisiert. Sina ist für die Ausbildung der R7-Photorezeptorzellen in den Ommatidien des Komplexauges essentiell (Carthew and Rubin, 1990). In Verbindung mit *Phyllopod* reguliert Sina die Differenzierung dieses Zelltyps posttranslational, indem es den transkriptionellen Repressor *Tramtrack* in die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse führt (vgl. Abb. 4 in der Einleitung). Ein Funktionsausfall von Sina führt daher zur Stabilisierung des *Tramtrack*-Proteins, so dass der Differenzierungsprozess der R7-Photorezeptorzellen permanent blockiert ist. Eine solche Situation findet man bei natürlichen Sina-Mutanten: Fliegen mit einer carboxyterminalen Deletion im Sina-Locus fehlen die R7-Photorezeptorzellen (vgl. Abb. 3 in der Einleitung). Da dieser Phänotyp auch bei Fliegen auftritt, die bezüglich dieser Deletion heterozygot sind, wirkt das verkürzte Protein gegenüber dem Wildtyp-Protein dominant-negativ. Ein vergleichbarer dominant-negativer Effekt ist bei einer Überexpression der *Xenopus* Mutante XSiah-2ΔC, die der natürlichen Sina Mutante in *Drosophila* entspricht, in *Xenopus* Embryonen nicht zu beobachten: *Xenopus* Larven, denen die XSiah-2ΔC mRNA injiziert wurde, zeigen dieselben Augendefekte wie nach einer entsprechenden Überexpression des Wildtyp Proteins (Abb. 23). Die unterschiedliche Wirkung der äquivalenten Mutanten bei *Drosophila* und bei *Xenopus* kann unterschiedliche Gründe haben. Ein Gendosis-Effekt kommt als eine mögliche Ursache in Betracht. Der größte Unterschied zwischen den injizierten *Xenopus* Larven und den Sina-Mutanten (homo- oder heterozygot) besteht darin, dass die *Xenopus* Larven neben dem verkürzten Protein noch über zwei Wildtyp Allele verfügen. Dagegen haben heterozygote Sina Mutanten nur ein Wildtyp Allel, Homozygote besitzen überhaupt keines mehr. Diese unterschiedliche Kopienzahl von Wildtyp Allelen sowie das unterschiedliche Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutanten Allel führen zu unterschiedlichen Gendosen in *Xenopus* und *Drosophila*. Der Einfluß der Gendosis auf den Phänotyp wird gerade in der Augenentwicklung beobachtet, beispielsweise für das Pax-6 (Schedle et al., 1996). So haben verschiedene Kopienzahlen von Pax-6 in transgenen Mäusen sehr unterschiedliche Phänotypen zur Folge. Die induzierten Defekte im Augenbereich reichen von Anomalien einzelner Augenbestandteile wie einer Hyperplasie der Iris bis hin zu einer starken Reduktion der Augengröße, wie sie eigentlich ursprünglich bei einem Funktionsausfall von Pax-6 beschrieben wurde (zur Übersicht: Zuker, 1994).

Im Vergleich zum Funktionsausfall von Sina in *Drosophila*, der zu einem Verlust der R7-Photorezeptorzellen führt, ist der molekulare Zusammenhang zwischen der Überexpression

und der Augenreduktion nicht offensichtlich. In Anbetracht der stimulierenden Wirkung von Sina auf den neuronalen Differenzierungsprozeß ist bei einer Überexpression eher eine Induktion ektopischer R7-Photorezeptorzellen zu erwarten, wie es tatsächlich bei der Überexpression seines Interaktionspartners *Phyllopod* (Chang et al., 1995) oder bei einem Funktionsausfall von *Tramtrack* (Lai et al., 1996) beobachtet wurde. Vermutlich übernehmen das *Drosophila Seven in absentia* wie auch die Vertebraten Homologen, einschließlich XSiah-2, noch weitere konservierte Funktionen, die den Phänotyp bei ihrer Überexpression erklären. Zahlreiche Transfektionsexperimente mit den Säuger-Homologen von *Seven in absentia* (Siah-1) zeigen den inhibitorischen Einfluß auf das Zellwachstum, in dem sie zugleich anti-proliferierend und pro-apoptotisch wirken (Amson et al., 1996; Nemani et al., 1996; Linares-Cruz et al., 1998; Matsuzawa et al., 1998; Roperch et al., 1999; Relaix et al., 2000). Untersuchungen einer Forschungsgruppe demonstrieren eine direkte Beteiligung von Siah-1 am mitotischen Programm, hauptsächlich während der Kernteilung und der Zytokinese. So blockiert das humane Siah-1 das Zellwachstum nach stabiler Transfektion in eine humanen Brustkrebs-Zelllinie (Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999). Multi-nukleäre Riesenzellen mit nicht duplizierten Zentrosomen, die Initiatoren zur Ausbildung der Spindelfaser, sind die Folge dieser Überexpression. Dies bietet einen Erklärungsansatz, weshalb eine Überexpression von *Seven in absentia* in *Drosophila* wie in *Xenopus* gleichermaßen eine Reduktion der Augengröße bewirkt. Möglicherweise reguliert *Seven in absentia* nicht nur Differenzierungsprozesse, sondern auch die Zellteilung während der Augenentwicklung. Auf der Suche nach neuen genetischen Interaktionen des *Drosophila Seven in absentia* wurde *peanut* isoliert, ein Septin-Gen, das den Phänotyp der Sina Mutanten verstärkt (Carthew et al., 1994) und interessanterweise an der Zytokinese bei Invertebraten und Vertebraten beteiligt ist (Neufeld et al., 1994; McKie et al., 1997). Direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem humanen *peanut*-Homolog (PNUTL) und HumSiah-1 wurden bislang jedoch noch nicht untersucht.

DcoH/PCD als neuer Interaktionspartner scheint nicht an diesem Prozess beteiligt zu sein: Die Überexpression von DcoH/PCD hat keinen Einfluß auf den XSiah-2 induzierten Phänotyp. Dies zeigen Koinjektionen mit XSiah-2 und DcoH/PCD (Abb. 27), bei denen die Anzahl der injizierten Embryonen mit verkleinerten Augen unverändert ist (Tab. 2). Gleichzeitig beeinflusst XSiah-2 nicht die bei einer Überexpression von DcoH/PCD induzierte Bildung ektopischer Pigmentzellen (Abb. 27 D). Zudem hat die Überexpression der XSiah-2 Δ C Mutante, der der zur Interaktion mit DcoH/PCD notwendige C-Terminus fehlt

(Abb. 12 C), unverändert eine reduzierte Augengröße zur Folge (Abb. 23). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Interaktion mit DCoH/PCD keine Bedeutung für den XSiah-2 induzierten Phänotyp hat. Diese Befunde dokumentieren insgesamt, dass beide Interaktionspartner während der Embryogenese von Vertebraten unabhängig voneinander wirken können.

Eine veränderte Expression von Pax-6, dem *master gene* in der Augenentwicklung, ist nicht die Ursache für die XSiah-2 induzierten Augendefekte. In *in situ* Hybridisierungen konnten weder quantitativ noch qualitativ Veränderungen im Expressionsprofil des *Xenopus* Pax-6 nachgewiesen werden (Abb. 25). Demnach wirkt XSiah-2 entweder in der Signalkaskade stromabwärts von Pax-6 oder es übernimmt in einem anderen, Pax-6 unabhängigen Signalweg regulatorische Funktionen. Tatsächlich wurde in jüngster Zeit ein neues Mitglied der *sine oculis* Genfamilie, *optix* identifiziert (Seimiya and Gehring, 2000), das unabhängig von einer Pax-6 Expression, ektopische Augen in *Drosophila* induzieren kann. Vermutlich ist das *Seven in absentia* an diesem bislang unbekannten regulatorischen Signalweg beteiligt.

Die Herstellung von Mäusen mit einer homozygoten Deletion des Siah-2-Gens, konnte keinen entscheidenden Beitrag zur Klärung dieser Fragestellungen leisten. Entsprechende Mäuse weisen keinen auffälligen Phänotyp auf (Holloway et al., 1997). Möglicherweise können die zwei weiteren Siah-1-Varianten in der Maus den Verlust von Siah-2 funktionell kompensieren. Ein vergleichbarer experimenteller Ansatz, um die Funktion des *Seven in absentia* in *Xenopus laevis* auszuschalten, ist aufgrund der Tetraploidie des Organismus nur sehr schwer möglich. Eine spezifische Interferenz der Genfunktion durch Mikroinjektion doppelsträngiger mRNA (*RNAi*-Methode) in *Xenopus* Eiern wäre jedoch, wie die Arbeiten von Wianny und Zernicka-Goetz (2000) mit Maus Embryonen zeigen, theoretisch möglich.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die strukturell und funktionell konservierte Bedeutung von XSiah-2 für die Augenentwicklung bei Vertebraten hin. Die Abbildung 28 faßt die vorliegenden Daten dieser Arbeit vergleichend mit bekannten Daten in *Drosophila* schematisch zusammen, die für eine konservierte Bedeutung des *Seven in absentia* Gens in der Augenentwicklung sprechen: **(1)** Die Primärstruktur des XSiah-2 Proteins ist zu 67 % identisch mit dem homologen Protein in *Drosophila* (Sina), und somit evolutionär stark konserviert. **(2)** Beide Proteine sind maternal als RNA im Ei prälokalisiert und werden in der embryonalen Entwicklung insbesondere im Auge exprimiert. **(3)** Die Überexpression beider Faktoren bedingt eine Reduktion der Augengröße. **(4)** Eine

Inaktivierung des Sina Gens führt in *Drosophila* zu einem Verlust R7-Photorezeptorzellen. Vergleichbare Daten bei Inaktivierung des *Xenopus* Homologs liegen nicht vor.

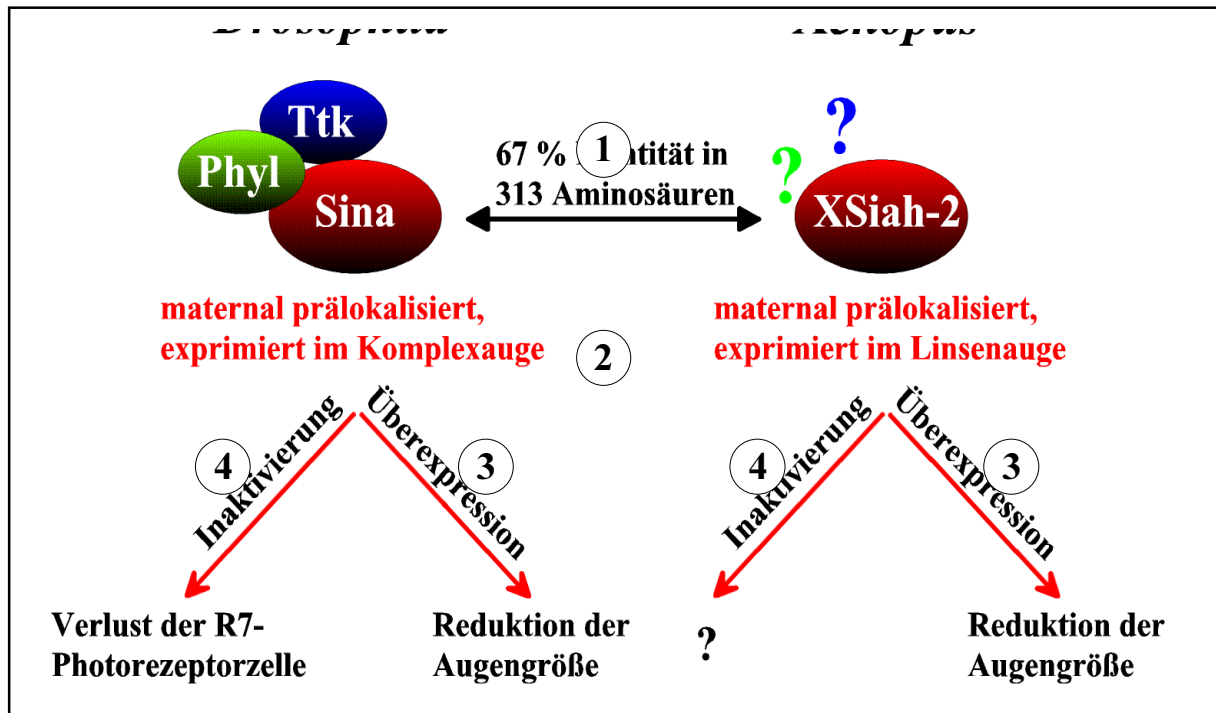


Abb. 28 Hinweise zur konservierten Funktion des *Drosophila* Seven in absentia (Sina) und des *Xenopus* Homologs (XSiah-2) in der Augenentwicklung

Im Vergleich zu *Xenopus* sind für das *Drosophila* Seven in absentia die regulatorischen Wechselbeziehungen zu *Phyllopod* (Phyl) und *Tramtrack* (Ttk) bekannt, die eine bessere funktionelle Einordnung dieses konservierten Faktors erlauben. Homologe von *Phyllopod* (Phyl) und *Tramtrack* (Ttk) sind bislang in Vertebraten jedoch noch nicht isoliert worden. Das DCoH/PCD ist offensichtlich nicht in diesem zellulären Prozess beteiligt, sondern kooperiert als neuer Interaktionspartner vermutlich an einer anderen Stelle mit XSiah-2.

5. Zusammenfassung

- (1) In dieser Arbeit wurde das *Xenopus Seven in absentia* Homolog (XSiah-2) aus einer *Xenopus* Oozyten cDNA-Bank isoliert. Das XSiah-2 Protein ist evolutionär stark konserviert. Mit 85 % Aminosäuren-Identität weist XSiah-2 die höchste Homologie zu den murinen und humanen Siah-2 Proteinen auf.
- (2) *Two Hybrid* Analysen in der Hefe bestätigen eine *in vivo* Protein-Protein-Interaktion zwischen XSiah-2 mit dem *Xenopus* Dimerisierungskofaktor der HNF1-Transkriptionsfaktoren, DCoH/PCD. Für diese Interaktion sind die letzten 53 Aminosäuren im C-Terminus des XSiah-2 Proteins ausreichend und notwendig.
- (3) *In situ* Hybridisierungen und RT-PCR Analysen in *Xenopus* zeigen, dass XSiah-2 wie dessen Interaktionspartner als maternale RNA wie DCoH/PCD im Ei prälokalisiert ist, die im weiteren Verlauf der Embryogenese in den kranialen Neuralstrukturen, insbesondere im Auge und im Vorderhirn, sowie entlang des Rückenmarks nachweisbar sind. Da DCoH/PCD ebenfalls im pigmentierten Epithel des Auges (PE) exprimiert wird, stimmt die Expression beider Faktoren nicht nur zeitlich (maternal), sondern zum Teil auch räumlich (PE) überein.
- (4) Es ist bekannt, dass das *Drosophila Seven in absentia* wie auch die homologen Siah-2 Proteine bei Säugern einige Faktoren über eine Ubiquitin vermittelten Proteolyse postranslational regulieren. DCoH/PCD wird jedoch nicht durch XSiah-2 degradiert. Dies zeigen Western Blot Analysen mit Lysaten aus transient mit Myc-DCoH/PCD und XSiah-2 transfizierten Zellen, bei denen keine signifikanten Veränderungen in der Expression des Myc-DCoH/PCD Proteins beobachtet wurden.
- (5) Embryonen, denen im Zwei-Zell Stadium XSiah-2 RNA injiziert wurden, weisen auf der injizierten Seite Augendefekte auf, die aus der Überexpression eines funktionellen XSiah-2 Proteins resultieren. Dies zeigt die Bedeutung von XSiah-2 in der Entwicklung des Vertebraten-Auges. Eine veränderte Expression von Pax-6 ist nicht die Ursache für die XSiah-2 induzierten Augendefekte.
- (6) DCoH/PCD hat keinen Einfluß auf den XSiah-2 induzierten Phänotyp und umgekehrt. Dies zeigen Koinjektionen mit DCoH/PCD und Injektionen mit der Deletionsmutante XSiah-2 Δ C. Demnach können XSiah-2 und DCoH/PCD unabhängig voneinander wirken.

6. Literatur

Amson,R.B., Nemani,M., Roperch,J.P., Israeli,D., Bougueleret,L., Le,G., I, Medhioub,M., Linares-Cruz,G., Lethrosne,F., Pasturaud,P., Piouffre,L., Prieur,S., Susini,L., Alvaro,V., Millasseau,P., Guidicelli,C., Bui,H., Massart,C., Cazes,L., Dufour,F., Bruzzoni-Giovanelli,H., Owadi,H., Hennion,C., Charpak,G., and Telerman,A. (1996). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3953-3957.

Ausubel, F.J., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience, New York.

Bartkowski,S., Zapp,D., Weber,H., Eberle,G., Zoidl,C., Senkel,S., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 421-431.

Beermann, W. (1952). Chromomeren Konstanz und Spezifische Modifikation der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organ Differenzierung von Chironomus tentans. *Chromosoma* 5, 139–198.

Bernier,G., Panitz,F., Zhou,X., Hollemann,T., Gruss,P., and Pieler,T. (2000). Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* 93, 59-69.

Blau,N. and Dhondt,J.L. (1993). Tetrahydrobiopterin deficiency and an international database of patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 338, 255-261.

Blau,N., Thony,B., Spada,M., and Ponzzone,A. (1996). Tetrahydrobiopterin and inherited hyperphenylalaninemias. *Turk. J. Pediatr.* 38, 19-35.

Bonini,N.M., Bui,Q.T., Gray-Board,G.L., and Warrick,J.M. (1997). The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124, 4819-4826.

Borden,K.L., Lally,J.M., Martin,S.R., O'Reilly,N.J., Etkin,L.D., and Freemont,P.S. (1995). Novel topology of a zinc-binding domain from a protein involved in regulating early *Xenopus* development. *EMBO J.* 14, 5947-5956.

Bruzzoni-Giovanelli,H., Faille,A., Linares-Cruz,G., Nemani,M., Le Deist,F., Germani,A., Chassoux,D., Millot,G., Roperch,J.P., Amson,R., Telerman,A., and Calvo,F. (1999). SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process. *Oncogene* 18, 7101-7109.

Buratowski,S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.

Carthew,R.W., Neufeld,T.P., and Rubin,G.M. (1994). Identification of genes that interact with the sina gene in *Drosophila* eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11689-11693.

- Carthew,R.W. and Rubin,G.M. (1990). Seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* *63*, 561-577.
- Chang,H.C., Solomon,N.M., Wassarman,D.A., Karim,F.D., Therrien,M., Rubin,G.M., and Wolff,T. (1995). phyllopod functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in *Drosophila*. *Cell* *80*, 463-472.
- Chen,J.D. and Li,H. (1998). Coactivation and corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *8*, 169-190.
- Chen,L. (1999). Combinatorial gene regulation by eukaryotic transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 48-55.
- Chen,R., Amoui,M., Zhang,Z., and Mardon,G. (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila* [see comments]. *Cell* *91*, 893-903.
- Cheyette,B.N., Green,P.J., Martin,K., Garren,H., Hartenstein,V., and Zipursky,S.L. (1994). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* *12*, 977-996.
- Chow,R.L., Altmann,C.R., Lang,R.A., and Hemmati-Brivanlou,A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* *126*, 4213-4222.
- Citron,B.A., Davis,M.D., and Kaufman,S. (1992). Purification and biochemical characterization of recombinant rat liver phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *3*, 93-100.
- Citron,B.A., Kaufman,S., Milstien,S., Naylor,E.W., Greene,C.L., Davis,M.D. (1993). Mutation in the 4a-carbinolamine dehydratase gene leads to mild hyperphenylalaninemia with defective cofactor metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* *53*, 768-774.
- Cronk,J.D., Endrizzi,J.A., and Alber,T. (1996). High-resolution structures of the bifunctional enzyme and transcriptional coactivator DCoH and its complex with a product analogue. *Protein Sci.* *5*, 1963-1972.
- Culotti,J.G. and Merz,D.C. (1998). DCC and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 609-613.
- Danilchick,M., Peng,H.B., and Kay,B.K. (1991). *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Pictorial collage of embryonic stages. *Methods Cell Biol.* *36*, 679-681.
- Dawid,I.B. and Sargent,T.D. (1988). *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* *240*, 1443-1448.
- Dawid,I.B., Sargent,T.D., and Rosa,F. (1990). The role of growth factors in embryonic induction in amphibians. *Curr. Top. Dev. Biol.* *24*, 261-288.
- Della,N.G., Bowtell,D.D., and Beck,F. (1995). Expression of Siah-2, a vertebrate homologue of *Drosophila* sina, in germ cells of the mouse ovary and testis. *Cell Tissue Res.* *279*, 411-419.
- Della,N.G., Senior,P.V., and Bowtell,D.D. (1993). Isolation and characterisation of murine homologues of the *Drosophila* seven in absentia gene (sina). *Development* *117*, 1333-1343.

- Depaepe,V., Cuvelier,L., Thony,B., and Resibois,A. (2000). Pterin-4 α -carbinolamine dehydratase in rat brain. I. Patterns of co-localization with tyrosine hydroxylase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75, 76-88.
- Dickson,B.J. (1998). Photoreceptor development: breaking down the barriers. *Curr. Biol.* 8, R90-R92.
- Drewes,T., Clairmont,A., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1994). Estrogen-inducible derivatives of hepatocyte nuclear factor-4, hepatocyte nuclear factor-3 and liver factor B1 are differently affected by pure and partial antiestrogens. *Eur. J. Biochem.* 225, 441-448.
- Endrizzi,J.A., Cronk,J.D., Wang,W., Crabtree,G.R., Alber,T. (1995). Crystal structure of DCoH, a bifunctional, protein-binding transcriptional coactivator. *Science* 28, 556-559.
- Eskinazi,R., Thony,B., Svoboda,M., Robberecht,P., Dasselasse,D., Heizmann,C.W., Van Laethem,J.L., and Resibois,A. (1999). Overexpression of pterin-4 α -carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 in human colon cancer. *Am. J. Pathol.* 155, 1105-1113.
- Evan,G.I., Lewis,G.K., Ramsay,G., and Bishop,J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* 5, 3610-3616.
- Flatmark,T. (2000). Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand.* 168, 1-17.
- Freemont,P.S. (2000). RING for destruction? *Curr. Biol.* 10, R84-R87.
- Fujiwara,M., Uchida,T., Osumi-Yamashita,N., and Eto,K. (1994). Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 57, 31-38.
- Gehring,W.J. and Ikeo,K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15, 371-377.
- Germani,A., Romero,F., Houlard,M., Camonis,J., Gisselbrecht,S., Fischer,S., and Varin-Blank,N. (1999). hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* 19, 3798-3807.
- Grunz,H. (1990).The role of inducing factors in early embryonic development. *Ontogenez* 21, 229-241.
- Gryfe,R., Swallow,C., Bapat,B., Redston,M., Gallinger,S., and Couture,J. (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer* 21, 233-300.
- Halder,G., Callaerts,P., and Gehring,W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- Harland,R.M. (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 685-695.

- Hauer,C.R., Rebrin,I., Thony,B., Neuheiser,F., Curtius,H.C., Hunziker,P., Blau,N., Ghisla,S., and Heizmann,C.W. (1993). Phenylalanine hydroxylase-stimulating protein/pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase from rat and human liver. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 4828-4831.
- Heanue,T.A., Reshef,R., Davis,R.J., Mardon,G., Oliver,G., Tomarev,S., Lassar,A.B., and Tabin,C.J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev.* 13, 3231-3243.
- Heasman,J., Crawford,A., Goldstone,K., Garner-Hamrick,P., Gumbiner,B., McCrea,P., Kintner,C., Noro,C.Y., and Wylie,C. (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos. *Cell* 79, 791-803.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Hill,R.E., Favor,J., Hogan,B.L., Ton,C.C., Saunders,G.F., Hanson,I.M., Prosser,J., Jordan,T., Hastie,N.D., and van,H., V (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene [published erratum appears in Nature 1992 Feb 20;355(6362):750]. *Nature* 354, 522-525.
- Hirsch,N. and Harris,W.A. (1997). Xenopus Pax-6 and retinal development. *J. Neurobiol.* 32, 45-61.
- Hmani,M., Ghorbel,A., Boulila-Elgaied,A., Ben Zina,Z., Kammoun,W., Drira,M., Chaabouni,M., Petit,C., and Ayadi,H. (1999). A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 363-367.
- Holloway,A.J., Della,N.G., Fletcher,C.F., Largespada,D.A., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Bowtell,D.D. (1997). Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia. *Genomics* 41, 160-168.
- Hu,G., Chung,Y.L., Glover,T., Valentine,V., Look,A.T., and Fearon,E.R. (1997). Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* 46, 103-111.
- Hu,G. and Fearon,E.R. (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol. Cell Biol.* 19, 724-732.
- Huang,C.Y., Max,E.E., and Kaufman,S. (1973). Purification and characterization of phenylalanine hydroxylase-stimulating protein from rat liver. *J. Biol. Chem.* 248, 4235-4241.
- Ishikawa,K., Nash,S.R., Nishimune,A., Neki,A., Kaneko,S., and Nakanishi,S. (1999). Competitive interaction of seven in absentia homolog-1A and Ca²⁺/calmodulin with the cytoplasmic tail of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Genes Cells* 4, 381-390.
- Jean,D., Ewan,K., and Gruss,P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech. Dev.* 76, 3-18.

- Johnen,G. and Kaufman,S. (1997). Studies on the enzymatic and transcriptional activity of the dimerization cofactor for hepatocyte nuclear factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 13469-13474.
- Kaufman,S., Pollock,R.J., Summer,G.K., Das,A.K., and Hajra,A.K. (1990). Dependence of an alkyl glycol-ether monooxygenase activity upon tetrahydropterins. *Biochim. Biophys. Acta* *1040*, 19-27.
- Kay, B.K. and Peng, H.B. (1991). *Xenopus laevis: Practical uses in cell and molecular biology*. Academic press Inc.: *Methods in Cell Biology* *36*.
- Keats,B.J. and Corey,D.P. (1999). The usher syndromes. *Am. J. Med. Genet.* *89*, 158-166.
- Keller,S.A., Jones,J.M., Boyle,A., Barrow,L.L., Killen,P.D., Green,D.G., Kapousta,N.V., Hitchcock,P.F., Swank,R.T., and Meisler,M.H. (1994). Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. *Genomics* *23*, 309-320.
- Kim,J.L. and Burley,S.K. (1995). PCD/DCoH: more than a second molecular saddle. *Structure.* *3*, 531-534.
- Kozak,M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8125-8148.
- Kozak,M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* *234*, 187-208.
- Kroll,K.L. and Kirschner,M.W. (1999). Easy passage: germline transgenesis in frogs [comment]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 14189-14190.
- Kugler,W., Wagner,U., and Ryffel,G.U. (1988). Tissue-specificity of liver gene expression: a common liver-specific promoter element. *Nucleic Acids Res.* *16*, 3165-3174.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*: 680-685.
- Lai,Z.C., Harrison,S.D., Karim,F., Li,Y., and Rubin,G.M. (1996). Loss of tramtrack gene activity results in ectopic R7 cell formation, even in a sina mutant background. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 5025-5030.
- Lei,X.D. and Kaufman,S. (1998a). Identification of hepatic nuclear factor 1 binding sites in the 5' flanking region of the human phenylalanine hydroxylase gene: implication of a dual function of phenylalanine hydroxylase stimulator in the phenylalanine hydroxylation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 1500-1504.
- Lei,X.D. and Kaufman,S. (1998b). Human white blood cells and hair follicles are good sources of mRNA for the pterin carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of HNF1 for mutation detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *248*, 432-435.
- Lei,X.D. and Kaufman,S. (1999). Characterization of expression of the gene for human pterin carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of HNF1. *DNA Cell Biol.* *18*, 243-252.
- Li,S., Li,Y., Carthew,R.W., and Lai,Z.C. (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* *90*, 469-478.

- Linares-Cruz,G., Bruzzoni-Giovanelli,H., Alvaro,V., Roperch,J.P., Tuynder,M., Schoevaert,D., Nemani,M., Prieur,S., Lethrosne,F., Piouffre,L., Reclar,V., Faille,A., Chassoux,D., Dausset,J., Amson,R.B., Calvo,F., and Telerman,A. (1998). p21WAF-1 reorganizes the nucleus in tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1131-1135.
- Liu,H., Ma,C., and Moses,K. (1996). Identification and functional characterization of conserved promoter elements from glass: a retinal development gene of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 56, 73-82.
- Lorick,K.L., Jensen,J.P., Fang,S., Ong,A.M., Hatakeyama,S., and Weissman,A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 11364-11369.
- Macdonald,R., Barth,K.A., Xu,Q., Holder,N., Mikkola,I., and Wilson,S.W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267-3278.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mannervik,M., Nibu,Y., Zhang,H., and Levine,M. (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science* 284, 606-609.
- Martinez-Noel,G., Niedenthal,R., Tamura,T., and Harbers,K. (1999). A family of structurally related RING finger proteins interacts specifically with the ubiquitin-conjugating enzyme UbcM4. *FEBS Lett.* 454, 257-261.
- Matsuzawa,S., Takayama,S., Froesch,B.A., Zapata,J.M., and Reed,J.C. (1998). p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J.* 17, 2736-2747.
- McGinnis,W., Garber,R.L., Wirz,J., Kuroiwa,A., and Gehring,W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- McKie,J.M., Sutherland,H.F., Harvey,E., Kim,U.J., and Scambler,P.J. (1997). A human gene similar to *Drosophila melanogaster* peanut maps to the DiGeorge syndrome region of 22q11. *Hum. Genet.* 101, 6-12.
- Mendel,D.B. and Crabtree,G.R. (1991a). HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 677-680.
- Mendel,D.B., Khavari,P.A., Conley,P.B., Graves,M.K., Hansen,L.P., Admon,A., and Crabtree,G.R. (1991b). Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 254, 1762-1767.
- Mendel,D.B., Khavari,P.A., Conley,P.B., Graves,M.K., Hansen,L.P., Admon,A., and Crabtree,G.R. (1991c). Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 254, 1762-1767.
- Miki,Y., Swensen,J., Shattuck-Eidens,D., Futreal,P.A., Harshman,K., Tavtigian,S., Liu,Q., Cochran,C., Bennett,L.M., and Ding,W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.

- Nagatsu,T. and Stjarne,L. (1998). Catecholamine synthesis and release. Overview. *Adv. Pharmacol.* *42*, 1-14.
- Nastos,A., Pogge,v.S., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1998). The embryonic expression of the tissue-specific transcription factor HNF1alpha in *Xenopus*: rapid activation by HNF4 and delayed induction by mesoderm inducers. *Nucleic Acids Res.* *26*, 5602-5608.
- Nemani,M., Linares-Cruz,G., Bruzzoni-Giovanelli,H., Roperch,J.P., Tuynder,M., Bougueleret,L., Cherif,D., Medhioub,M., Pasturaud,P., Alvaro,V., der,S.H., Cazes,L., Le Paslier,D., Le,G., I, Israeli,D., Dausset,J., Sigaux,F., Chumakov,I., Oren,M., Calvo,F., Amson,R.B., Cohen,D., and Telerman,A. (1996). Activation of the human homologue of the *Drosophila sina* gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 9039-9042.
- Neufeld,T.P. and Rubin,G.M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* *77*, 371-379.
- Neufeld,T.P., Tang,A.H., and Rubin,G.M. (1998). A genetic screen to identify components of the *sina* signaling pathway in *Drosophila* eye development. *Genetics* *148*, 277-286.
- Nichol,C.A., Smith,G.K., and Duch,D.S. (1985). Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* *54*, 729-764.
- Nielsen,D.A. and Shapiro,D.J. (1986). Preparation of capped RNA transcripts using T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* *14*, 5936.
- Nieuwkoop, P.D. and Faber J. (1975). Normal table of *Xenopus laevis*. (Daudin) 2nd. Edition. Elsevier / North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Ohto,H., Kamada,S., Tago,K., Tominaga,S.I., Ozaki,H., Sato,S., and Kawakami,K. (1999). Cooperation of six and *eya* in activation of their target genes through nuclear translocation of *Eya*. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6815-6824.
- Oliver,G. and Gruss,P. (1997). Current views on eye development. *Trends Neurosci.* *20*, 415-421.
- Olson,E.N. and Rosenthal,N. (1994). Homeobox genes and muscle patterning. *Cell* *79*, 9-12.
- Pan,D. and Rubin,G.M. (1998). Targeted expression of teashirt induces ectopic eyes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 15508-15512.
- Pignoni,F., Hu,B., Zavitz,K.H., Xiao,J., Garrity,P.A., and Zipursky,S.L. (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development [published erratum appears in *Cell* 1998 Feb 20;92(4):following 585]. *Cell* *91*, 881-891.
- Pogge von Strandmann,E., Senkel,S., and Ryffel,G.U. (2000). Ectopic pigmentation in *xenopus* in response to DCoH/PCD, the cofactor of HNF1 transcription factor/pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase [In Process Citation]. *Mech. Dev.* *91*, 53-60.

- Pogge von Strandmann,E., Senkel,S., and Ryffel,G.U. (1998). The bifunctional protein DCoH/PCD, a transcription factor with a cytoplasmic enzymatic activity, is a maternal factor in the rat egg and expressed tissue specifically during embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *42*, 53-59.
- Pogge von Strandmann,E., Nastos,A., Holewa,B., Senkel,S., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1997). Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1 alpha gene activation during *Xenopus* development. *Mech. Dev.* *64*, 7-17.
- Pogge von Strandmann,E., Zoidl,C., Nakhei,H., Holewa,B., Pogge,v.S., Lorenz,P., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1995 a). A highly specific and sensitive monoclonal antibody detecting histidine-tagged recombinant proteins. *Protein Eng* *8*, 733-735.
- Pogge von Strandmann,E. and Ryffel,G.U. (1995 b). Developmental expression of the maternal protein XDCoH, the dimerization cofactor of the homeoprotein LFB1 (HNF1). *Development* *121*, 1217-1226.
- Pontoglio,M., Barra,J., Hadchouel,M., Doyen,A., Kress,C., Bach,J.P., Babinet,C., and Yaniv,M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* *84*, 575-585.
- Relaix,F., Wei,X., Li,W., Pan,J., Lin,Y., Bowtell,D.D., Sassoon,D.A., and Wu,X. (2000).** Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 2105-2110.
- Resibois,A., Cuvelier,L., Svoboda,M., Heizmann,C.W., and Thony,B. (1999). Immunohistochemical localisation of pterin-4alpha-carbinolamine dehydratase in rat peripheral organs. *Histochem. Cell Biol.* *111*, 381-390.
- Rhee,K.H., Stier,G., Becker,P.B., Suck,D., and Sandaltzopoulos,R. (1997). The bifunctional protein DCoH modulates interactions of the homeodomain transcription factor HNF1 with nucleic acids. *J. Mol. Biol.* *265*, 20-29.
- Romero,F. and Fischer,S. (1996). Structure and function of vav. *Cell Signal.* *8*, 545-553.
- Roperch,J.P., Lethrone,F., Prieur,S., Piouffre,L., Israeli,D., Tuynder,M., Nemani,M., Pasturaud,P., Gendron,M.C., Dausset,J., Oren,M., Amson,R.B., and Telerman,A. (1999). SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 8070-8073.
- Sankila,E.M., Pakarinen,L., Kaariainen,H., Aittomaki,K., Karjalainen,S., Sistonen,P., and de la,C.A. (1995).** Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 93-98.
- Satijn,D.P., Gunster,M.J., van der Vlag,J., Hamer,K.M., Schul,W., Alkema,M.J., Saurin,A.J., Freemont,P.S., van Driel,R., Otte,A.P. (1997). RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4105-4113.
- Saurin,A.J., Borden,K.L., Boddy,M.N., and Freemont,P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* *21*, 208-214.

- Schallreuter,K.U., Wood,J.M., Pittelkow,M.R., Gutlich,M., Lemke,K.R., Rodl,W., Swanson,N.N., Hitzemann,K., and Ziegler,I. (1994 a). Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 263, 1444-1446.
- Schallreuter,K.U., Lemke,R., Brandt,O., Schwartz,R., Westhofen,M., Montz,R., and Berger,J. (1994 b). Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology* 188, 269-275.
- Schallreuter,K.U., Wood,J.M., Ziegler,I., Lemke,K.R., Pittelkow,M.R., Lindsey,N.J., and Gutlich,M. (1994 c). Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim. Biophys. Acta* 1226, 181-192.
- Schedl,A., Ross,A., Lee,M., Engelkamp,D., Rashbass,P., van Heyningen,V., Hastie,N.D. (1996). Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86, 71-82.
- Scriver,C.R. (1994). Science, medicine and phenylketonuria. *Acta Paediatr. Suppl* 407, 11-18.
- Seimiya,M. and Gehring,W.J. (2000). The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127, 1879-1886.
- Seong,C., Jeong,S., Park,D., Yoon,J., Oh,Y., Yim,J., Han,K., and Baek,K. (1998). Molecular characterization of the Drosophila melanogaster gene encoding the pterin 4alpha-carbinolamine dehydratase. *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 273-278.
- Shen,W. and Mardon,G. (1997). Ectopic eye development in Drosophila induced by directed dachshund expression. *Development* 124, 45-52.
- Sladek,F.M. and Darnell,J.E. (1992). Mechanisms of liver-specific gene expression. *Curr Opin. Genet. Dev.* 2, 256-259.
- Song,J., Xia,T., and Jensen,R.A. (1999). PhhB, a Pseudomonas aeruginosa homolog of mammalian pterin 4a-carbinolamine dehydratase/DCoH, does not regulate expression of phenylalanine hydroxylase at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* 181, 2789-2796.
- Sourdive,D.J., Transy,C., Garbay,S., and Yaniv,M. (1997). The bifunctional DCOH protein binds to HNF1 independently of its 4-alpha-carbinolamine dehydratase activity. *Nucleic Acids Res.* 25, 1476-1484.
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- Spemann, H., and Mangold H. (1938). Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale Univ. Press.
- St Arnaud,R. (1999). Dual functions for transcriptional regulators: myth or reality? *J. Cell Biochem. Suppl* 32-33, 32-40.
- Suck,D. and Ficner,R. (1996). Structure and function of PCD/DCoH, an enzyme with regulatory properties. *FEBS Lett.* 389, 35-39.

- Tang,A.H., Neufeld,T.P., Kwan,E., and Rubin,G.M. (1997). PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* 90, 459-467.
- Thöny,B., Neuheiser,F., Kierat,L., Blaskovics,M., Arn,P.H., Ferreira,P., Rebrin,I., Ayling,J., Blau,N. (1998). Hyperphenylalaninemia with high levels of 7-biopterin is associated with mutations in the PCBD gene encoding the bifunctional protein pterin-4a-carbinolamine dehydratase and transcriptional coactivator (DCoH). *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1302-1311.
- Thöny,B., Auerbach,G., and Blau,N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.* 347 Pt 1, 1-16.
- Thöny,B., Heizmann,C.W., and Mattei,M.G. (1994). Chromosomal location of two human genes encoding tetrahydrobiopterin-metabolizing enzymes: 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase maps to 11q22.3-q23.3, and pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase maps to 10q22. *Genomics* 19, 365-368.
- Toy,J. and Sundin,O.H. (1999). Expression of the optx2 homeobox gene during mouse development. *Mech. Dev.* 83, 183-186.
- Toy,J., Yang,J.M., Leppert,G.S., and Sundin,O.H. (1998). The optx2 homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10643-10648.
- Tronche,F. and Yaniv,M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-587.
- Vershon,A.K. (1996). Protein interactions of homeodomain proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 392-396.
- Walther,C. and Gruss,P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-1449.
- Waterham,H.R. and Cregg,J.M. (1997). Peroxisome biogenesis. *Bioessays* 19, 57-66.
- Wayne,S., Der,K., V, Schloss,M., Polomeno,R., Scott,D.A., Hejtmancik,J.F., Sheffield,V.C., and Smith,R.J. (1996). Localization of the Usher syndrome type ID gene (Ush1D) to chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1689-1692.
- Weber,H., Strandmann,E.P., Holewa,B., Bartkowski,S., Zapp,D., Zoidl,C., and Ryffel,G.U. (1996). Regulation and function of the tissue-specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1) during *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 297-304.
- Wianny,F. and Zernicka-Goetz,M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.
- Wu,L.C., Wang,Z.W., Tsan,J.T., Spillman,M.A., Phung,A., Xu,X.L., Yang,M.C., Hwang,L.Y., Bowcock,A.M., and Baer,R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat. Genet.* 14, 430-440.

Xiao,Z.X., Chen,J., Levine,A.J., Modjtahedi,N., Xing,J., Sellers,W.R., and Livingston,D.M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375, 694-698.

Xu,P.X., Zhang,X., Heaney,S., Yoon,A., Michelson,A.M., and Maas,R.L. (1999). Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development* 126, 383-395.

Zhang,J., Guenther,M.G., Carthew,R.W., and Lazar,M.A. (1998). Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12, 1775-1780.

Zhao,G., Xia,T., Song,J., and Jensen,R.A. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* possesses homologues of mammalian phenylalanine hydroxylase and 4 alpha-carbinolamine dehydratase/DCoH as part of a three-component gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1366-1370.

Zuker,C.S. (1994). On the evolution of eyes: would you like it simple or compound? *Science* 265, 742-743

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. G. U. Ryffel am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Str540/1-1) gefördert.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Dr. E. Pogge von Strandmann** für die Möglichkeit und die Mittel, diese Arbeit im Rahmen Ihres DFG-Projektes anzufertigen, ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre engagierte Betreuung und intensive Beratung, die in entscheidendem Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. G. U. Ryffel danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für seine ständige Unterstützung, Diskussions- und Hilfsbereitschaft in vielen theoretischen wie praktischen Fragen.

Frau S. Senkel danke ich für die Herstellung der Deletionsmutante XSiah-2 Δ R und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Bei **Frau U. Golonka** vom Institut für Anatomie bedanke ich mich für die gute Anleitung bei der histologischen Analyse der *Xenopus* Embryonen.

Allen anderen **Mitarbeitern der Arbeitsgruppe III** des Instituts für Zellbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und zahlreichen Diskussionen.

Ganz besonders danke ich meinen **Eltern, Geschwistern** und meiner Freundin **Susanne Eckert**, für ihren starken Rückhalt, den sie mir fortwährend gegeben haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

09.10.1969

Sven Bogdan
geboren in Dortmund
ledig

Schulausbildung

1976 - 1990

Grundschule und Gymnasium in Dortmund
Abschluß: Abitur

Zivildienst

Sept. 1990 - Okt. 1991

Städt. Kliniken Dortmund

Wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 1991 – März 1996

Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit dem Schwerpunkt Zytologie und Molekulargenetik

April 1996 - März 1997

Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. W.-H. Kunau an der Medizinischen Fakultät, Institut für Physiologische, Abteilung Zellbiochemie. **Thema:** „Biogenese von Peroxisomen. Biochemische, molekular- und zellbiologische Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung des peroxisomalen Membranproteins Pex3p aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.“

März 1997

Abschluß: Diplom-Biologe

Seit April 1997

Dissertation am Institut für Zellbiologie unter der Anleitung von Dr. E. Pogge von Strandmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G.U. Ryffel.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Das *Xenopus* Homolog von *Seven in absentia* (XSiah-2) – Bedeutung eines neuen Interaktionspartners von DCoH/PCD in der Entwicklung des Vertebraten-Auges“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Dipl. Biol. Sven Bogdan befürworte.

Essen, den

Prof. Dr. G. U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Sven Bogdan

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

Sven Bogdan